

**UJI KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING
SENDURO HASIL PEMBEKUAN LAMBAT PADA
SUHU AKHIR YANG BERBEDA**

SKRIPSI

Oleh :

Ahmad Fadhil Jayadikarta

NIM. 135050101111180



**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2018**

**UJI KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING
SENDURO HASIL PEMBEKUAN LAMBAT PADA
SUHU AKHIR YANG BERBEDA**

SKRIPSI

Oleh :

Ahmad Fadhil Jayadikarta

NIM. 135050101111180

Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Sarjana Peternakan pada Fakultas
Peternakan Universitas Brawijaya

**PROGRAM STUDI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**



RIWAYAT HIDUP

Ahmad Fadhil Jayadikarta, lahir di Takengon 13 Juni 1996, anak pertama dari dua bersaudara yang lahir dari pasangan Bapak Jumadil Enka dan Ibu Sase Rolita. Penulis lulus dari TK Buntul Sirih tahun 2001, lulus dari SD Negeri 8 Takengon Kecamatan Lut Tawar tahun 2007, lulus dari SMP Negeri 1 Takengon, Aceh Tengah tahun 2010 lulus dari SMA Negeri 4 Takengon, Kabupaten Aceh Tengah tahun 2013, pada tahun yang sama penulis diterima sebagai mahasiswa di Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Penulis pernah melaksanakan Praktek Kerja Lapang (PKL) di PT. Fortune Megah Perkasa-Bogor, Jawa Barat di bidang penggemukan sapi potong dengan judul “ *Manajemen Penggemukan Sapi Potong Peranakan Ongole (PO), Simental dan Brahman Cross di PT. Fortuna Megah Perkasa Bogor, Jawa Barat* ” selama satu bulan pada tanggal 15 Agustus – 15 September 2016.

THE QUALITY TEST OF SPERMATOZOA SENDUROGOAT OF SLOW FREEZING METHOD RESULTS AT DIFFERENT FINAL TEMPERATURE

Ahmad Fadhil J.¹⁾, Gatot Ciptadi²⁾, and Sri Wahjuningsih²⁾

¹⁾ Student of Faculty Animal Science, University of Brawijaya

²⁾ Lecturer of Faculty Animal Science, University of Brawijaya

Email: ahmadfadhil311@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this research was to determine spermatozoa quality which frozen using a slow freezing method of a decrease of $-1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ at the final temperature of -40°C and -80°C . This research method was laboratory experiment through case survey with 2 different final freezing method that was at temperature -40°C (P1) and -80°C (P2) using *Mr. Frosty*[®]. Semen fresh used is semen goats senduro was 2 years with body weight 70-80 kg intensive care, semen be accommodated using the vagina artificial. Semen was diluted with an *Andromed*[®] diluent, and equilibrate at 4°C for 2 hours, and frozen in the ultrafreezer for 24 hours. The *post-thawing* semen samples were examined for sperm motility and viability using a light microscope. The data were analyzed statistically using unpaired t-test. The results of this research showed that there was highly significant different effect ($P < 0.01$) on the motility and viability, while the abnormality did not gave significant different ($P > 0.05$) of the frozen semen between treatment. The

mean of motility, viability, and abnormalities of spermatozoa at P2 after freezing were respectively $10.93 \pm 0.04\%$; $22.93 \pm 0.11\%$; $11.91 \pm 0.02\%$. The conclusion of this research was the final freezing at -80°C has higher *post-thawing* semen quality than the final freezing at -40°C .

Key words: Senduro goat, spermatozoa, slow freezing, motility, viability



UJI KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING SENDURO HASIL METODE PEMBEKUAN LAMBAT PADA SUHU AKHIR YANG BERBEDA

Ahmad Fadhil J.¹⁾, Gatot Ciptadi²⁾, dan Sri Wahjuningsih²⁾

¹⁾Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

²⁾Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

Email: ahmadfadhil311@gmail.com

RINGKASAN

Kambing Senduro merupakan plasma nutfah asli Indonesia, saat ini penyebaran kambing Senduro di Indonesia masih kurang. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi serta penyebaran ternak kambing Senduro di Indonesia adalah dengan cara melakukan inseminasi buatan (IB). Teknologi IB berperan penting dalam peningkatan kualitas mutu genetik dengan memanfaatkan ternak pejantan unggul, dan pengontrolan penyakit reproduksi lebih mudah apabila dibandingkan dengan kawin alam. Permasalahan dalam proses teknologi IB yaitu pada proses pembekuan semen, proses pembekuan yang menggunakan N₂ (nitrogen) cair membutuhkan peralatan yang mahal dan kompleks, seperti kontainer N₂, mahalnya harga N₂ cair serta terbatasnya distribusi N₂ cair. Upaya yang dilakukan untuk menghindari kekurangan dari proses pembekuan menggunakan N₂ salah satunya yaitu menggunakan *freezer*. Penggunaan *freezer* pada

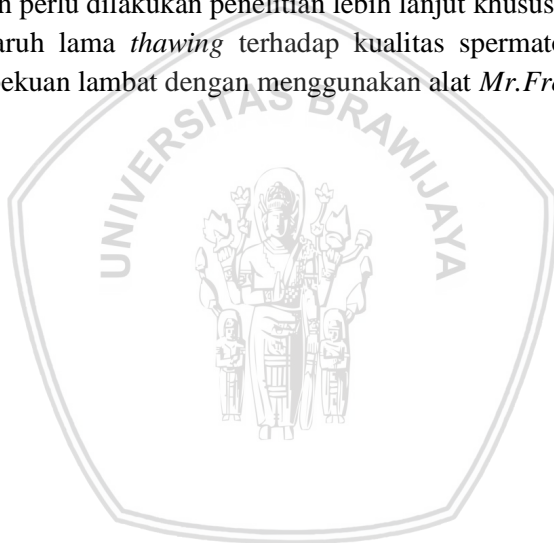
proses pembekuan semen diharapkan mampu mempertahankan kualitas spermatozoa setelah pembekuan.

Penelitian dilaksanakan selama 6 bulan dimulai pada tanggal 12 April sampai 15 September 2017 di Laboratorium Lapang Sumber Sekar, Kecamatan. Dau, Kabupaten. Malang dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu akhir pembekuan -40°C dan -80°C dengan metode lambat menggunakan alat *Mr.Frosty*[®] terhadap kualitas spermatozoa *post thawing* kambing Senduro. Manfaat penelitian ini adalah sebagai bahan informasi dan data mengenai pengaruh suhu akhir pembekuan yang berbeda pada semen kambing Senduro menggunakan metode lambat. Materi penelitian ini adalah semen segar dari 3 ekor pejantan kambing Senduro yang berumur 1,5 – 2 tahun dengan bobot badan berkisar antara 70 – 80 kg yang dipelihara secara intensif dengan pemberian pakan hijauan sebanyak 4-5 kg/ekor/hari dan pemberian pakan konsentrat sebanyak 600-800 gram/ekor/hari. Metode dalam penelitian ini menggunakan metode percobaan melalui studi kasus. Data analisis yang digunakan adalah uji t tidak berpasangan, dengan 2 perlakuan pembekuan. Pembekuan dilakukan pada suhu -40°C (P1) dan -80°C (P2), masing-masing perlakuan diulang 16 kali. Variabel yang diamati adalah kualitas spermatozoa *post thawing* yang meliputi motilitas individu, viabilitas, dan abnormalitas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas dan viabilitas spermatozoa *post thawing* kambing Senduro yang dibekukan menggunakan metode lambat dengan suhu akhir yang berbeda menunjukkan hasil berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) dengan rata-rata motilitas tiap perlakuan P1 ($2,81 \pm 0,02\%$); P2 ($10,93 \pm 0,04\%$), dan rata-rata viabilitas tiap perlakuan

P1($6,20 \pm 0,03\%$); P2($22,93 \pm 0,11\%$). Variabel abnormalitas hasil pembekuan spermatozoa *post thawing* kambing Senduro menunjukkan hasil tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan rata-rata abnormalitas tiap perlakuan P1($11 \pm 0\%$); P2($11,91 \pm 0,02\%$).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah metode pembekuan lambat dengan suhu akhir -80°C (P2) mempunyai nilai motilitas, dan viabilitas lebih tinggi dibanding dengan suhu akhir pembekuan -40°C (P1). Saran dari hasil penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut khususnya dalam pengaruh lama *thawing* terhadap kualitas spermatozoa hasil pembekuan lambat dengan menggunakan alat *Mr.Frosty*®.





DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1 Kerangka konsep penelitian.....	8
2 Kerangka operasional penelitian.....	28
3 Hasil pemeriksaan viabilitas dan abnormalitas dengan perbesaran 400x.....	35
4 Rataan motilitas individu spermatozoa setelah proses pendinginan dan pembekuan.....	38
5 Rataan viabilitas individu spermatozoa setelah proses pendinginan dan pembekuan.....	42
6 Rataan abnormalitas individu spermatozoa setelah proses pendinginan dan pembekuan.....	47

DAFTAR ISI

Isi	Halaman
RIWAYAT HIDUP.....	i
KATA PENGANTAR.....	iii
ABSTRACT.....	v
RINGKASAN.....	vii
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Kerangka Pikir	5
1.6 Hipotesis	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kambing Senduro	11
2.2 Pengencer Komersial	12
2.3 Ekuilibrase	13
2.4 Proses Pembekuan (Kriopreservasi)	14
2.5 Semen Beku	16
2.6 Analisa Kualitas Semen.....	17

BAB III MATERI DAN METODE

3.1	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
3.2	Materi Penelitian.....	21
3.2.1	Alat dan Bahan.....	21
3.3	Metode Penelitian.....	22
3.4	Variabel Penelitian.....	23
3.4.1	Pemeriksaan Makroskopis Semen.....	23
3.4.2	Pemeriksaan Mikroskopis Semen.....	24
3.5	Analisis Data.....	27
3.6	Kerangka Operasional Penelitian.....	28
3.7	Batasan Istilah.....	29

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Kualitas Semen Segar Kambing Senduro	31
4.2	Motilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Kambing Senduro.....	36
4.3	Viabilitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Kambing Senduro.....	41
4.4	Abnormalitas Spermatozoa <i>Post Thawing</i> Kambing Senduro.....	44

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan	49
5.2	Saran	49

DAFTAR PUSTAKA.....	51
----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	61
----------------------	-----------

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Penampungan semen segar kambing Senduro (kandang 1).....	61
2. Penampungan semen segar kambing Senduro (kandang 3).....	63
3. Penampungan semen segar kambing Senduro (kandang 4).....	65
4. Analisis statistik motilitas spermatozoa kambing Senduro.....	67
5. Analisis statistik viabilitas spermatozoa kambing Senduro.....	71
6. Analisis statistik abnormalitas spermatozoa kambing Senduro.....	75
7. Dokumentasi penelitian.....	79

DAFTAR SINGKATAN

Cm	=	Centimeter
dkk	=	Dan Kawan-Kawan
<i>et al</i>	=	<i>Et Alili</i>
g	=	Gram
IB	=	Inseminasi Buatan
Kg	=	Kilogram
ml	=	Mili Liter
N ²	=	Nitrogen
pH	=	Potensial Hidrogen
PTM	=	Post Thawing Motility
°C	=	Derajat Celcius
%	=	Persentase

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rata-rata kualitas semen segar kambing Senduro...	31
2. Rata-rata motiitas spermatozoa <i>post thawing</i> kambing Senduro.....	37
3. Rata-rata viabilitas spermatozoa <i>post thawing</i> kambing Senduro.....	41
4. Rata-rata abnormalitas spermatozoa <i>post thawing</i> kambing Senduro.....	45



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Esa karena atas semua petunjuk-Nyapenulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Kualitas Spermatozoa Kambing Senduro Hasil Pembekuan Lambat Pada Suhu Akhir Yang Berbeda” ini untuk memenuhi persyaratan gelar Strata satu (S-1) Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS., selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Ir. Sri Wahjuningsih, M.Si., selaku dosen pembimbing pendamping yang telah banyak memberikan bimbingan dan saran dalam penyusunan skripsi.
2. Dr. Ir. Puguh Surjowardojo, MP., Ir. Mashudi, M.Agr.Sc., dan Dr. Herly Evanuarini, S.Pt, MP selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, arahan dan saran selama penyusunan skripsi, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
3. Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Suyadi, MS., selaku Dekan Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya yang telah memberikan sarana dan prasarana selama studi.
4. Dr. Ir. Sri Minarti, MP., selaku Ketua Jurusan Peternakan dan Dr. Ir. Imam Thohari., selaku Sekretaris Jurusan Peternakan Universitas Brawijaya yang telah membantu dan membina dalam kelancaran studi.
5. Dr. Agus Susilo, S.Pt.,MP., selaku Ketua Program Studi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya yang telah banyak membina kelancaran proses studi.

6. Bapak Jumadil Enka dan Ibu Sase Rolita selaku orang tua yang selalu mendukung dan memberikan doa restu.
7. Teman-teman yang telah memberikan motivasi serta ide dalam menyelesaikan penulisan tugas skripsi ini.

Penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca guna menyempurnakan laporan skripsi ini dan semoga laporan skripsi ini bermanfaat bagi kita semua.

Malang, April 2018

Penulis







BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kambing atau sering dikenal sebagai ternak ruminansia kecil merupakan ternak herbivora yang sangat populer di kalangan peternak di Indonesia. Perkembangan jumlah populasi ternak kambing di Indonesia di daerah Jawa Timur mengalami peningkatan, pada tahun 2011 ternak kambing mencapai \pm 2.830.915 ekor dan pada tahun 2015 telah mencapai \pm 3.136.513 ekor (Badan Pusat Statistik, 2015). Kambing Senduro merupakan kambing hasil persilangan antara kambing Etawa, kambing Kacang dan kambing Jawarandu yang berada di daerah Senduro, kabupaten Lumajang. Sifat heterosit yang diperoleh dari persilangan ini adalah terbentuk bangsa kambing baru yaitu kambing Senduro. Kambing Senduro memiliki ukuran lebih besar daripada kambing Kacang dengan warna bulu putih, bentuk telinga panjang menggantung ke bawah dan terpilin, bentuk punggung agak melengkung sampai titik terendah, di bagian tengah tubuh membentuk sudut dan semakin ke belakang semakin tinggi sampai pinggul, memiliki ekor pendek. Litter size 1-2 ekor, produksi susu kambing Senduro mampu mencapai 0.8 s/d 1.8 liter/ekor/hari. Sementara untuk produksi dagingnya, ternak kambing Senduro jantan bisa memiliki bobot hidup mencapai 120 Kg per ekor (Anonimous, 2015).

Kambing Senduro merupakan plasma nutfah asli Indonesia, saat ini penyebaran kambing Senduro di Indonesia masih kurang. Upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi serta penyebaran ternak kambing Senduro di Indonesia adalah dengan cara melakukan penerapan

teknologi reproduksi. Penerapan teknologi reproduksi khususnya inseminasi buatan (IB) dan fertilisasi *in vitro* (FIV) hingga saat ini masih populer dengan menggunakan spermatozoa dalam bentuk semen cair dan beku yang diolah dari hasil koleksi semen melalui ejakulasi (Rizal dan Nasrullah, 2004). Teknologi ini berperan penting dalam peningkatan mutu genetik yang tinggi serta dapat mengurangi terjadinya penyebaran penyakit melalui kontak langsung antara organ reproduksi jantan dan betina yang menyebabkan terjadinya infeksi yang menyerang organ reproduksi seperti *brucellosis*, *vibriosis*, *leptospirosis*, *tuberkolosis*, dan lain sebagainya, dengan dilakukannya teknologi ini maka dapat meningkatkan produktivitas serta penyebaran populasi ternak yang lebih baik dengan harapan semen dari pejantan yang ditampung dapat dioptimalkan untuk beberapa betina dalam jangka waktu panjang (Lubis, Dasrul, Thasmi dan Akbar, 2013). Ihsan, (2011) tingkat keberhasilan IB ditentukan oleh kualitas semen yang digunakan, fertilitas induk yang diinseminasi, sarana dan prasarana IB, keahlian inseminator dalam melakukan inseminasi dan kemampuan peternak dalam mendeteksi dan pelaporan birahi.

Teknologi IB memerlukan semen yang berkualitas baik dengan harapan ternak betina dapat menghasilkan kebuntingan dalam sekali penyuntikan. Susilawati (2013), proses-proses yang dilakukan setelah penampungan semen bertujuan untuk mengoptimalkan penggunaan semen pejantan unggul, serta dapat menyimpan semen pejantan unggul dalam waktu yang lama. Berbagai cara telah dikembangkan untuk mengatasi masalah penyimpanan semen, penyimpanan semen dapat dilakukan dengan cara pembekuan atau kriopreservasi. Teknik kriopreservasi merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan,

tumbuhan ataupun materi genetika lain (termasuk semen) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel didalam sel sehingga fungsi fisiologis, biologis, dan morfologis tetap ada (Boediono, 2003).

Teknik kriopreservasi dapat dibedakan atas teknik kriopreservasi konvensional atau lambat (*conventional slow freezing*) dan kriopreservasi secara cepat (*rapid freezing*). Teknik kriopreservasi konvensional adalah teknik kriopreservasi yang lebih menekankan pada proses pembekuan lambat, suhu diturunkan secara bertahap dengan mesin pendingin yang dapat diprogram misalnya dengan kecepatan 1°C/menit hingga suhu -35°C, sedangkan teknik kriopreservasi secara cepat, pembekuan sel atau organ serta larutan berada dalam nitrogen cair (-196°C) dan membentuk padatan *solid glass* (Kostaman dan Setioko, 2011). Penurunan suhu secara cepat akan mengakibatkan kerusakan pada sel. Park and Graham (1992), menjelaskan penurunan suhu yang sangat cepat akan terbentuk kristal es yang halus didalam sel yang mempunyai energi permukaan yang besar dan tidak stabil serta cenderung membentuk kristal es yang besar, kondisi ini akan mengakibatkan kerusakan dan kematian sel. Proses pembekuan semen di N₂ cair mempunyai kekurangan dan keterbatasan dalam penanganan semen beku. Situmorang (2002) proses pembekuan semen menggunakan N₂ cair membutuhkan peralatan yang mahal dan kompleks, seperti kontainer nitrogen cair, terbatasnya N₂ cair karena distribusi belum lancar, mahalnya harga N₂ cair serta terbatasnya ketersediaan kontainer.

Penelitian ini menggunakan metode pembekuan lambat dengan penurunan suhu secara bertahap menggunakan alat *Mr.Frosty*[®]. Metode dari *Mr.Frosty*[®] adalah dengan

penambahan isopropil alkohol 100% pada *container* dan disimpan pada *freezer* dengan kecepatan penurunan suhu $-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ (Anonymous, 2010). Metode pembekuan dengan alat *Mr.Frosty*[®] ini dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama. Metode tersebut diharapkan dapat mengatasi permasalahan dalam penanganan semen beku menggunakan N_2 cair. Berdasarkan uraian diatas pembekuan semen kambing Senduro dicoba menggunakan metode pembekuan lambat dengan suhu akhir pembekuan -40°C dan -80°C dengan laju penurunan suhu $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh suhu akhir pembekuan yang berbeda menggunakan metode pembekuan lambat terhadap kualitas spermatozoa kambing Senduro serta ingin mengetahui apakah *freezer* dapat menjadi metode pembekuan yang baru dan sebagai alternatif pembekuan semen selain N_2 cair.

1.2 Rumusan Masalah

Keberhasilan yang mempengaruhi pembekuan lambat diantaranya kecepatan pembekuan, jenis dan konsentrasi krioprotektan, suhu akhir pembekuan, serta tipe keadaan fisiologis bahan yang disimpan. Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana kualitas spermatozoa kambing Senduro setelah PTM (*Post Thawing Motility*) yang diencerkan menggunakan medium pengencer komersial dan dibekukan menggunakan metode pembekuan lambat ($-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) pada suhu akhir -40°C dan -80°C .

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui pengaruh suhu akhir pembekuan -40°C dan -80°C dengan metode pembekuan lambat

menggunakan alat *Mr.Frosty*[®]dengan penurunan suhu -1°C /menit terhadap kualitas spermatozoa beku kambing Senduro.

2. Mengetahui fisibilitas suhu akhir pembekuan menggunakan metode pembekuan lambat.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu:

1. Sebagai bahan informasi dan data mengenai pengaruh suhu akhir pembekuan yang berbeda pada kualitas spermatozoa beku kambing Senduro menggunakan metode pembekuan lambat.
2. Diharapkan dapat menjadi suatu kajian ilmiah serta referensi bagi akademis tentang pengembangan metode alternatif pembekuan lambat.

1.5 Kerangka Pikir

Semen ternak kambing Senduro yang telah melewati seleksi dari berbagai pejantan dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan populasi kambing Senduro di Indonesia, seleksi dilakukan dengan harapan dapat menghasilkan kualitas semen pejantan yang baik guna menunjang produktivitasnya. Kualitas semen kambing senduro dipengaruhi oleh beberapa faktor menurut Heriyanta (2013) faktor yang mempengaruhi kualitas semen pejantan unggul, antara lain: umur pejantan, sifat genetik, suhu dan musim, frekuensi ejakulasi dan makan. Pengoptimal penggunaan teknologi IB merupakan suatu cara dalam mempercepat peningkatan jumlah populasi serta produktivitas kambing senduro.

Teknologi IB pada umumnya dilakukan menggunakan semen beku. Dalam proses pembekuan semen, akibat perlakuan

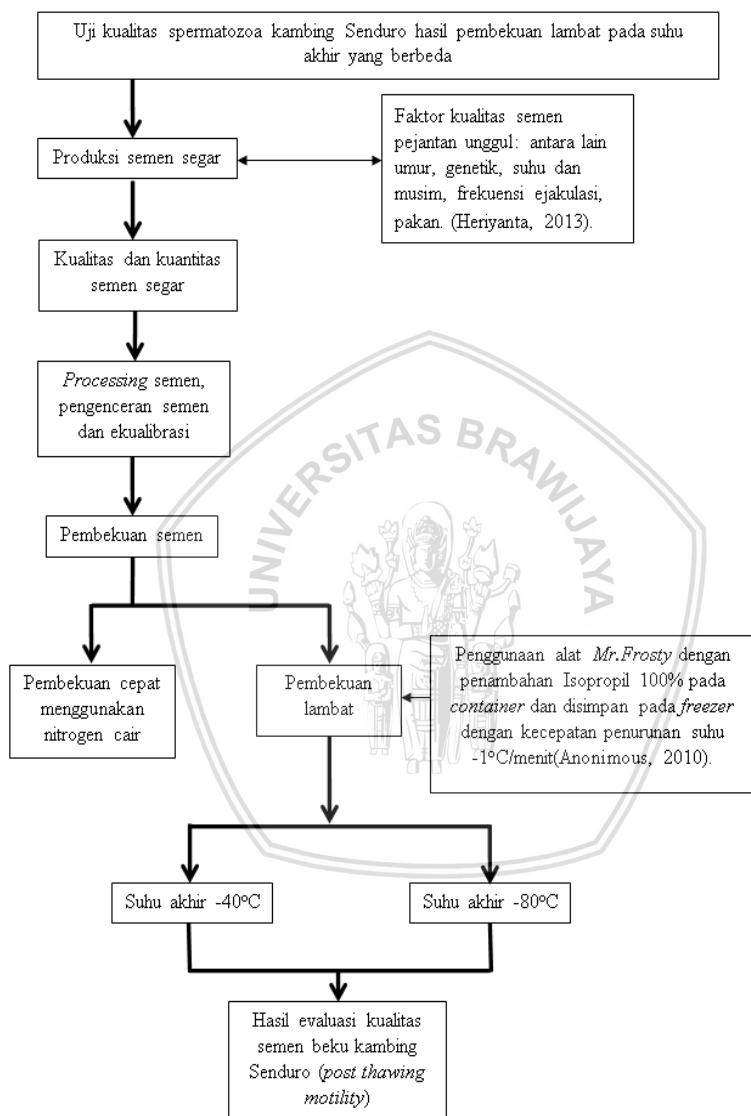
suhu yang sangat rendah (-196°C) akan membentuk kristal-kristal es dan peningkatan konsentrasi elektrolit intraseluler yang menyebabkan kerusakan sel spermatozoa. Larutan pengencer harus ditambahkan senyawa krioprotektan untuk mengurangi efek tersebut (Rizal dan Herdis, 2005). Pemilihan jenis pengencer yang tepat merupakan salah satu cara untuk mengurangi kerusakan akibat proses pembekuan, menurut Surachman, Herdis, Setiadi dan Rizal (2006) bahan pengencer komersial telah tersedia sehingga dapat digunakan secara langsung seperti *Andromed*[®]. *Andromed*[®] merupakan salah satu pengencer komersial yang tidak mengandung bahan kuning telur sehingga tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme yang berasal dari kuning telur. Pengencer komersial ini siap untuk langsung digunakan sebagai bahan pengencer karena komposisi dari pengencer ini sudah lengkap dengan bahan-bahan yang digunakan untuk kebutuhan spermatozoa dan mampu mencegah terjadinya kerusakan sel spermatozoa selama penyimpanan (Anonymous, 2001).

Setelah proses pengenceran semen maka pada tahap selanjutnya yaitu proses ekuilibrasi, proses ini dilakukan agar spermatozoa beradaptasi dengan pengencer yang digunakan sebelum dilakukannya pembekuan. Menurut Novianto, Sudarno dan Masithah (2014) spermatozoa dibiarkan dalam suhu 5°C selama 2 hingga 6 jam agar bisa menyeimbangkan cairan intraseluler dengan diluter yang mengandung gliserol sebelum proses pembekuan dimulai.

Teknik pembekuan semen merupakan teknik penyimpanan yang dilakukan pada suhu yang sangat rendah. Teknik pembekuan ini terbagi atas dua yaitu pembekuan lambat dan pembekuan cepat. Menurut Gazali dan Tambing (2010) prinsip dari pembekuan sel spermatozoa ialah pengeluaran air

dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel akan mati. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik pembekuan lambat menurut Kostaman dan Setioko (2011) sejumlah faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik pembekuan lambat adalah kecepatan pembekuan, jenis dan konsentrasi krioprotektan, suhu akhir pembekuan, dan tipe keadaan fisiologis bahan yang akan disimpan. Penggunaan *Mr.Frosty*® dalam pembekuan spermatozoa kambing senduro merupakan salah satu teknik dari pembekuan lambat dengan penurunan suhu yang konsisten. Anonimous, (2010) metode dari *Mr.Frosty*® adalah dengan penambahan Isopropil 100% pada *container* dan disimpan pada *freezer* dengan kecepatan penurunan suhu $-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$.

Uji kualitas spermatozoa setelah *thawing* merupakan faktor penentu keberhasilan dari proses pembekuan, menurut Standar Nasional Indonesia yang dikeluarkan oleh Badan Standardisasi Nasional (BSN), pemeriksaan semen beku segera sesudah dicairkan kembali (*post thawing*) pada suhu 37°C selama 30 detik harus menunjukkan spermatozoa hidup dan bergerak maju (*motil spermatozoa*) minimal 40 (empat puluh) persen (ICS 65. 020. 30). Ketiga sperma tersebut telah melampaui standar yang telah ditentukan. Kerangka pikir penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

1.6 Hipotesis

Perbedaan suhu akhir pembekuan dengan menggunakan metode pembekuan lambat berpengaruh positif terhadap kualitas spermatozoa *post thawing* (motilitas, viabilitas, abnormalitas) kambing Senduro.







BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kambing Senduro

Kambing Senduro merupakan salah satu kekayaan plasma nutfah asli Indonesia yang baru ditetapkan sebagai galur/ras kambing PE oleh Kementerian Pertanian pada tahun 2014 dengan dikeluarkannya Keputusan Kementerian Pertanian No.1055 tahun 2014, kambing Senduro merupakan kambing hasil persilangan antara kambing Ettawa, kambing Kacang dan kambing Jawarandu yang berada di daerah Senduro, kabupaten Lumajang (Anonimous, 2014).

Kambing Senduro merupakan jenis kambing yang bertipe dwiguna. Selain sebagai penghasil daging, kambing Senduro juga merupakan kambing yang baik untuk ternak penghasil susu, litter size 1-2 ekor, produksi susu kambing Senduro mampu mencapai 0,8 s/d 1,8 liter/ekor/hari. Sementara untuk produksi dagingnya, kambing Senduro jantan bisa memiliki bobot hidup mencapai 120 Kg/ekor (Anonimous, 2015). Menurut Hidayanto, (2015) pertambahan bobot badan harian kambing Senduro untuk jantan lebih tinggi dari pada betina, pertambahan bobot badan harian kambing jantan pasca sapih adalah $105,93 \pm 31,79$ gram dan betina pasca sapih adalah $94,58 \pm 30,60$ gram.

Menurut Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 1055/Kpts/SR.120/10/2014 tentang penetapan galur kambing Senduro bahwa habitat kambing peranakan Etawa Senduro terletak di sebuah desa yang berada di kecamatan Senduro Kabupaten Lumajang Provinsi Jawa Timur, ciri fisik kambing Senduro antara lain, corak warna dominan putih, jarang memiliki tanduk karena itu disebut

etawah gundul Senduro, kuping panjang, lemas, terpilin sampai 50 cm, ukuran postur panjang, tinggi dan lebih tebal, tinggi badan dapat mencapai 120 cm untuk jantan (Anonymous, 2013).

2.2 Pengencer Komersial

Penambahan bahan pengencer pada semen sebelum memasuki penyimpanan bertujuan untuk menyediakan sumber energi bagi spermatozoa sehingga dapat menjamin kelangsungan hidup spermatozoa selama proses penyimpanan atau pembekuan serta semen dapat disimpan dan digunakan dalam waktu yang lama. Pengencer yang digunakan yaitu bahan pengencer *Andromed*[®], *Andromed*[®] merupakan salah satu pengencer komersial berbahan dasar yang tidak menggunakan sumber protein asal hewan yang menjadi andalan untuk pengencer semen beku. Bahan komersial ini diharapkan dapat mempermudah penyiapan medium untuk pengenceran dan penyimpanan semen dalam jangka waktu panjang. *Andromed*[®] mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa, dan maltotriosa), mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lesitin, dan gliseril fosforil kolin (GPC) (Anonymous, 2011). Susilawati (2011) *Andromed*[®] merupakan suatu medium tanpa kuning telur untuk semen beku dan cair yang mempunyai angka fertilitas tinggi walaupun tanpa kandungan dari hewan aslinya. Selain itu juga tidak mempunyai resiko kontaminasi mikroorganisme serta mudah dalam penanganan dan waktu penyimpanan. Penggunaan bahan pengencer *Andromed*[®] sering digunakan dalam berbagai penelitian semen cair guna mencukupi kebutuhan hidup spermatozoa selama proses penyimpanan (Surachman, Herdis, Yulnawati, Rizal dan Maheswari, 2009).

Bahan pengencer diperlukan untuk dapat mempertahankan kualitas hidup spermatozoa, syarat-syarat bahan pengencer yaitu mengandung sumber energi untuk mencukupi kebutuhan spermatozoa, bersifat *buffer* untuk mempertahankan pH semen karena pH semen yang normal yaitu kisaran (6,5-7,0) apabila nilai pH semen semakin rendah atau semakin tinggi maka akan menyebabkan kematian, karena perubahan pH akan menyebabkan pembentukan asam laktat, mengandung antibiotik, berguna untuk pencegahan tumbuh dan berkembangnya bakteri yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa serta dengan pemberian pengencer dapat meningkatkan volume semen dengan harapan dapat meng inseminasi banyak betina akseptor (Puji, Ihsan dan Isnaini, 2014).

2.3 Ekuilibrase

Ekuilibrase merupakan waktu penyesuaian yang digunakan oleh semen yang sudah ditambahkan dengan larutan pengencer untuk menurunkan suhu spermatozoa dari suhu 36-37°C hingga mencapai 5°C sebelum dimasukkannya straw yang berisi semen kedalam nitrogen cair, hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya penurunan kualitas spermatozoa akibat pengaruh *cold shock* yang berlebihan sehingga motilitas spermatozoa masih tetap tinggi, pada tahap ini gliserol akan menembus kedalam sel spermatozoa untuk membentuk konsentrasi intraseluler dan ekstraseluler yang seimbang (Apriyanti, 2012).

Ekuilibrase dilakukan agar spermatozoa beradaptasi dengan bahan pengencer yang digunakan pada saat proses penurunan suhu, yang mana lama waktu ekuilibrase akan menentukan daya adaptasinya apabila lama ekuilibrase terlalu

singkat maka akan menyebabkan penurunan daya adaptasi spermatozoa terhadap pengencernya, namun jika waktu ekuilibrasi yang digunakan terlalu lama, maka spermatozoa akan semakin kehilangan banyak energi sehingga dapat menurunkan aktivitas spermatozoa (Melkianus, Jadi, Supit, Kusumaningrum dan Andrijanto, 2015). Selama proses ekuilibrasi spermatozoa dibiarkan dalam suhu 5⁰C selama 2 hingga 6 jam agar bisa menyeimbangkan cairan intraseluler dengan diluter yang mengandung gliserol sebelum proses pembekuan dimulai (Novianto, Sudarno dan Masithah, 2014). Hal ini ditambahkan oleh Kostaman dan Setioko (2011), hasil kualitas semen dengan waktu 4 jam memberikan pengaruh yang lebih baik apabila dibandingkan dengan waktu 2 jam dengan hasil penelitian bahwa terjadi penurunan motilitas dari sekitar 68-69% setelah pengenceran menjadi 56-59% setelah ekuilibrasi pada suhu 3-5⁰C, dan tidak ada perbedaan nyata antara jenis pengencer maupun waktu ekuilibrasi.

2.4 Proses Pembekuan (Kriopreservasi)

Kriopreservasi adalah suatu proses penghentian untuk sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel, dimana proses hidup ini dapat berlanjut setelah pembekuan (Mumu, 2009). Metode pembekuan (kriopreservasi) sel spermatozoa dibedakan atas pembekuan lambat (*slow freezing*), pembekuan cepat (*rapid freezing*), dan pembekuan sangat cepat (*ultra rapid freezing*). Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati. Ada dua

faktor utama selama proses kriopreservasi sel spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin (*cold-shock*) dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang menyebabkan pembentukan kristal es (Kostaman dan Setioko, 2011).

Kejutan dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak pada suhu tubuh sampai dibawah 0°C yang akan menurunkan viabilitas sel. Pengaruh utama dari kejutan dingin terhadap sel spermatozoa ialah penurunan motilitas dan daya hidup, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Pembentukan kristal es selama proses kriopreservasi sel spermatozoa menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit didalam sel, hal tersebut mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik, elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. (Gazali dan Tambing, 2002). Toelihere (1985) kecepatan penurunan temperatur secara bertahap yaitu 1°C per menit antara 5°C sampai -0°C, kecepatan 3°C per menit antara 0°C sampai -12°C, 5°C per menit antara -12°C sampai -50°C, 20 per menit antara -50°C sampai -100°C. Lama pembekuan memberikan pengaruh terhadap banyak tidaknya motilitas spermatozoa. Melkianus, Jadi, Supit, Kusumaningrum dan Andrijanto (2015) lama pembekuan selama 12 menit dari suhu 5°C sampai ke -80°C, spermatozoa dapat beradaptasi dengan baik dengan suhu pembekuan, karena penurunan suhu berlangsung secara bertahap dengan perlahan-lahan sehingga spermatozoa tidak mengalami *cold shock* yang berlebihan dan motilitas spermatozoa dapat bertahan lebih baik. Sedangkan pada lama perlakuan 4 dan 8 menit, spermatozoa akan mengalami *cold shock* akibat perubahan suhu yang

berlangsung lebih cepat sehingga dapat menyebabkan penurunan motilitas atau bahkan dapat menyebabkan kematian.

Motilitas spermatozoa dapat terjadi jika spermatozoa masih mempunyai membran yang masih berfungsi dengan baik sehingga dapat menghasilkan energi gerak yang aktif, jika motilitas spermatozoa mengalami penurunan maka disebabkan karena selama pembekuan terjadi perubahan suhu yang ekstrim sehingga akan merusak komposisi lipid membran plasma spermatozoa (Aku, Purwantara dan Toelihere, 2007). Selama proses pembekuan terjadi perubahan intraseluler akibat pengeluaran air berkaitan dengan pembentukan kristas es yang menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit didalam sel sehingga terjadi kerusakan sel-sel secara mekanik yang berpengaruh terhadap metabolisme spermatozoa (Pamungkas, Batubara dan Anwar, 2014).

2.5 Semen Beku

Semen beku saat ini telah menjadi kebutuhan setiap peternak untuk memenuhi bibit ternaknya. Semen beku merupakan semen yang telah mengalami proses pengenceran dengan bahan pengencer, kemudian ditambahkan gliserol dalam proses pembekuannya (Ismaya, 2014). Perkembangan terakhir ini semen beku telah digunakan sebagai sumber pembuatan bank materi genetik pada hewan atau ternak langka dan unggul yang mendekati kepunahan (Ciptadi, 2012)

Penyimpanan semen dalam bentuk beku memiliki beberapa keuntungan diantaranya adalah semen beku dapat mengatasi hambatan-hambatan waktu dan jarak. Spermatozoa yang dibekukan dan disimpan pada suhu -79°C didalam CO_2 padat dan alkohol tahan hidup 3 sampai 4 tahun, sedangkan pada suhu -196°C di dalam nitrogen cair spermatozoa tahan

hidup untuk waktu yang tak terhingga (Feradis, 2010). Menurut Ismaya (2014), semen beku memiliki beberapa manfaat yaitu efisiensi penggunaan pejantan, perkawinan tidak dibatasi waktu dan tempat, transportasi mudah, murah dan berkualitas serta tahan lama untuk disimpan. Namun demikian, menurut Toelihere (1993), jika kesehatan pejantan tidak diperhatikan semen beku mempunyai potensi tinggi untuk penyebarluasan penyakit-penyakit viral dan bakterial serta dapat mengawetkan pula beberapa penyakit yang terdapat didalam semen dan tidak musnah oleh penambahan antibiotik.

2.6 Analisa Kualitas Semen

Analisa kualitas semen pada kambing sama seperti analisa semen pada ternak lainnya. Uji kualitas semen dilakukan segera setelah penampungan atau sebelum diencerkan yang meliputi proses pemeriksaan makroskopis : volume, warna, konsistensi, pH, dan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi : motilitas massa, motilitas individu, presentasi hidup, konsentrasi, dan abnormalitas (Susilawati, 2011). Warna semen yang tertampung dapat langsung terbaca pada tabung penampung yang berskala. Semen kambing berwarna abu-abu hingga kekuningan dan diantara pejantan memiliki variasi warna. Setiap jenis ternak mempunyai batas-batas volume tertentu menurut bangsa, umur, ukuran badan, tingkatan makan, frekuensi penampungan dan berbagai faktor lain (Toelihere, 1993). Pada dasarnya volume ejakulasi kambing rata-rata 1 ml dengan *range* antara 0,5-1,2 ml (Susilawati, 2011).

Derajat keasaman atau pH diukur dengan cara mengambil sedikit semen dengan menggunakan *ose* dan diletakkan pada kertas lakmus atau pH meter kemudian dilihat

pH-nya, pH semen diuji dengan menggunakan pH *paper*, pH normal semen = 6,2-6,8 (Susilawati, 2011). Derajat keasaman sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari pH normal akan mengakibatkan spermatozoa lebih cepat mati (Suyadi, Susilawati dan Isnaini, 2004).

Motilitas massa atau gerakan massa spermatozoa semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak serta berpindah tempat, maka gerakan massa semakin baik, motilitas massa diamati dengan menggunakan mikroskop tanpa *cover glass* dengan perbesaran 400x atau 100x pada suhu yang dijaga konstan 37°C (Susilawati, 2011). Menurut Toelihere (1993) berdasarkan penilaian gerakan massa, kualitas semen dibagi dalam kategori yaitu : sangat baik (+++) terlihat adanya gelombang besar, gelap, banyak, tebal dan aktivitas sebagai gumpalan awan hitam pekat yang bergerak cepat berpindah-pindah tempat; baik (++) bila terdapat gelombang kecil-kecil, tipis, jarang, kurang jelas, dan bergerak lambat; cukup (+) jika tidak terlihat gelombang melainkan gerak individu yang aktif progresif; dan jelek (0) sedikit atau gerakan-gerakan individual.

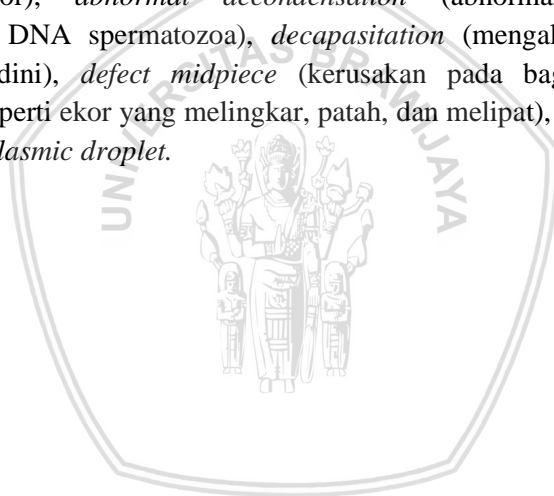
Persentase hidup mati atau viabilitas dapat dibedakan reaksinya terhadap warna tertentu, sel spermatozoa yang tidak motil dan dianggap mati akan menghisap warna dan spermatozoa yang motil dan yang hidup tidak menghisap warna. *Eosin* dan *negrosin* adalah perwarna sel yang paling baik dipergunakan. Adapun cara kerjanya adalah sebagai berikut, satu tetes semen segar ditetaskan pada ujung gelas objek dengan menggunakan ose. Larutan *eosin negrosin* ditetaskan satu tetes didekat semen segar, kemudian ditutup dengan gelas objek lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45° dan ditarik kearah ujung yang lain. Hasil olesan diamati pada mikroskop dengan

perbesaran 400x, spermatozoa yang menyerap warna berarti mati sedangkan yang tidak menyerap warna berarti hidup (Susilawati, 2011).

Ada beberapa teknik penghitungan konsentrasi spermatozoa, perhitungan dengan *haemocytometer*, perhitungan dengan *spectrophotometer*, perhitungan dengan *SDM5 photometer* serta pewarnaan diferensial dengan *eosin-negrosin*. Kriteria konsentrasi semen sapi maupun kambing adalah sebagai berikut (1) $< 1000 \times 10^6$: encer, (2) $1000-1500 \times 10^6$: sedang, (3) $> 1500 \times 10^6$: pekat (Feradis, 2010). Menurut Kartasudjana (2001), semakin kental semen yang diejakulasi oleh suatu organisme, dapat diartikan bahwa konsentrasi spermatozoa yang terkandung di dalamnya juga semakin tinggi. Spermatozoa yang baik memiliki konsentrasi yang berkisar antara $2000-2200 \times 10^6$ juta/ml.

Abnormalitas spermatozoa terjadi pada kepala atau ekor. Toelihere (1993) abnormalitas spermatozoa menjadi 2 yaitu abnormalitas primer meliputi: kepala terlalu besar (*macrochealic*), kepala terlalu kecil (*microcephalic*), kepala pendek melebar, pipih memanjang dan kepala rangkap (*piriformis*), ekor ganda (bagian tengah membesar dan berlipat membengkak, membesar) dan ekor yang melingkar, terputus atau ekor terbelah, abnormalitas sekunder meliputi: ekor terputus, kepala tanpa ekor, bagian tengah melipat, butiran protoplasma proksimal dan akrosom yang terlepas. Menurut Afiat, Yulnawati, Riyadi dan Arifiantini, (2015) abnormalitas spermatozoa dikelompokkan menjadi *pyriform* (bentuk yang menyempit di bagian *post acrosome*), *detached head* (kepala yang terpisah dari ekor), *pear shaped* (bagian anterior akrosom membulat dan bagian posterior akrosom mengecil, *macrocephalus* (kepala lebih besar), *microcephalus* (kepala

lebih kecil daripada normal), *double head* (satu sel memiliki dua kepala dan satu ekor), *nuclear vacuolus* (terdapat vacuola di bagian kepala spermatozoa yang menunjukkan abnormalitas inti dan kromatin sel), *underdeveloped* (perkembangan yang tidak sempurna, ukuran yang lebih kecil daripada normal, ekor pendek dengan material sel yang belum sempurna pada pengamatan selanjutnya), *round head* (bentuk kepala yang membulat), *abnormal contour* (bentuk yang abnormal di kepala maupun ekor), *abaxial* (terbentuk fossa perlekatan dibagian tengah ekor), *abnormal decondensation* (abnormalitas kondensasi DNA spermatozoa), *decapacitation* (mengalami kapasitasi dini), *defect midpiece* (kerusakan pada bagian *midpiece* seperti ekor yang melingkar, patah, dan melipat), dan *distal cytoplasmic droplet*.





BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Lapang Peternakan Sumber Sekar, Kec. Dau, Kab. Malang dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan April-September 2017.

3.2 Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen dari 3 ekor pejantan kambing Senduro berumur 2 tahun dengan bobot badan 70–80 kg yang dipelihara secara intensif dengan pemberian pakan hijauan sebanyak 4–5 kg/ekor/hari dan pemberian pakan konsentrat sebanyak 600–800 gram/ekor/hari dan digunakan untuk produksi semen di Laboratorium Sumber Sekar Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.

3.2.1 Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan yaitu:

Alat : Mikroskop cahaya, *ose*, *object glass*, *cover glass*, satu set *haemocytometer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *alumunium foil*, *hand tally counter*, pipet eritrosit, *waterbath*, tabung *Erlenmeyer*, gelas ukur, *cool top*, *cryovial*, *Freezer* suhu -40°C dan -80°C , *Mr.Frosty*®, penjepit, mikro pipet.

Bahan: Semen segar kambing Senduro, pewarna *eosin negrosin*, NaCl 3%, pengencer komersial / *Andromed*®, *aquabidest*.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu metode percobaan melalui studi kasus. Pembekuan dilakukan pada suhu akhir yang berbeda -40°C (P1) dan -80°C (P2), masing-masing perlakuan 16 kali ulangan. Variabel yang diamati adalah kualitas spermatozoa *post thawing* (motilitas, viabilitas dan abnormalitas). Hasil uji kualitas spermatozoa kemudian akan dianalisis menggunakan uji-t tidak berpasangan. Prosedur pelaksanaan penelitian sebagai berikut:

- a. Semen segar dengan kualitas yang baik diproses sebelum dilakukannya pembekuan, proses yang dilakukan diantaranya pemeriksaan makroskopis semen segar dan pemeriksaan mikroskopis semen segar.
- b. Dilakukan pengenceran menggunakan pengencer komersial dengan perbandingan 1:4 (*Andomed*[®] : *aquabidest*).
- c. Setelah pengenceran selanjutnya semen diekualibrasi selama ± 2 jam, dan dilakukan uji mikroskopis setelah 2 jam ekualibrasi kemudian dimasukan kedalam *cryovial*.
- d. *Cryovial* dimasukan ke dalam *tube* dan disimpan didalam alat *Mr. Frosty*[®] yang kemudian dibekukan didalam *freezer*, penurunan suhu dilakukan secara perlahan didalam *freezer* yang sudah di program.
- e. Setelah pembekuan selama 24 jam selanjutnya dilakukan pencairan kembali (*thawing*) dengan cara mengambil *cryovial* yang berisi spermatozoa dari dalam tabung *Mr. Frosty*[®] menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam *waterbath* pada suhu

37°C selama ± 3 menit, untuk selanjutnya dievaluasi kualitas spermatozoa setelah pencairan kembali (*post-thawing motility*).

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini antara lain:

3.4.1 Pemeriksaan Makroskopis Semen

3.4.1.1 Volume

Volume dapat dilihat langsung pada skala tabung penampung, volume semen per ejakulat berbeda menurut bangsa, umur, ukuran badan, tingkat konsumsi pakan, frekuensi penampungan dan berbagai faktor lain, volume ejakulasi kambing rata-rata 1 ml dengan *range* antara 0,5-1,2 ml (Susilowati, 2013). Volume dapat juga digunakan dalam menentukan jumlah spermatozoa per-ejakulasi bila dikalikan dengan konsentrasi (Lestari, Dadang dan Maidaswar, 2013).

3.4.1.2 Kosistensi

Tingkat konsistensi semen ditentukan dengan cara melihat dan menggoyangkan secara perlahan tabung yang berisi semen. Apabila gerakan permukaan semen lambat ketika digoyangkan, maka kosistensi semen dikatakan kental. Evans dan Maxwell, (1987) menjelaskan konsistensi dapat digunakan untuk memperkirakan konsentrasi spermatozoa secara cepat pada sampel semen yang diamati.

3.4.1.2 pH

Pengukuran pH dapat dilakukan dengan cara mengambil semen menggunakan ose dan diletakkan pada kertas lakmus atau pH meter, pH normal semen yaitu 6,2 – 7,0 (Ax, *et al.*, 2000). Apabila pH semen jauh dari kisaran pH normal maka dapat mengakibatkan kematian spermatozoa.

3.4.1.2 Bau dan warna

Aroma normal semen kambing berbau khas agak amis ketika dihirup. Bau tersebut menunjukkan bahwa semen yang diejakulasikan dalam keadaan normal dan tidak terkontaminasi. Kartasudjana (2001) semen normal umumnya memiliki bau yang khas dari hewan tersebut dan apabila terdapat bau busuk menunjukkan bahwa semen bercampur dengan nanah. Warna semen dapat ditentukan dengan cara dilihat secara langsung. Lopes (2002) kualitas semen dinyatakan baik apabila memiliki warna putih kekuningan. Semen dengan kualitas jelek ditandai dengan adanya warna merah di dalam semen segar, menurut Feradis (2011) adanya kuman-kuman *Pseudomonas Aeruginosa* didalam semen dapat menyebabkan warna hijau kekuning-kuningan apabila semen dibiarkan di suhu kamar. Gumpalan-gumpalan, bekuan dan kepingan-kepingan didalam semen menunjukkan adanya nanah yang umumnya berasal dari kelenjar-kelenjar pelengkap dari ampula. Semen yang berwarna gelap sampai merah muda menandakan adanya darah segar dalam jumlah berbeda dan berasal dari saluran kelamin urethra atau penis. Warna kecoklatan menunjukkan adanya darah yang telah mengalami dekomposisi.

3.4.2 Pemeriksaan Mikroskopis Semen

a. Motilitas Massa

Semen diambil menggunakan ose, diletakkan pada kaca objek dan diamati dengan menggunakan mikroskop tanpa kaca penutup dengan perbesaran 100 kali pada suhu yang dijaga konstan 37°C. Gerakan massa diamati dengan melihat gelombang pergerakan spermatozoa secara bersama-sama dan dihitung dengan 4 kriteria sebagai berikut: Penilaian sangat baik (+++) bila terlihat gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif bergerak, dinilai baik (++) gelombangnya kecil, tipis,

jarang, tidak jelas dan lamban, dinilai cukup (+) bila tidak ada gelombang hanya gerakan individual dan aktif progresif dan dinilai buruk (-) bila tidak ada gerakan sama sekali (Ax, *et al.*, 2000).

b. Motilitas Individu

Semen diambil satu tetes menggunakan ose, diletakkan pada kaca objek danditutup dengan kaca penutup. Gerak individu spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Kriteria motilitas adalah sebagai berikut: 0% jika spermatozoa imotil atau tidak ada gerakan sama sekali, 50% jika spermatozoa bergerak ditempat atau bergerak melingkar dan kurang dari 50% bergerak progresif, 50-80% jika spermatozoa bergerak secara progresif dan membentuk gerakan massal, 90% jika spermatozoa bergerak sangat progresif dan terbentuk gelombang tebal dan 100% jika gerakan sangat progresif dan terbentuk gelombang seketika terus menerus (Ax, *et al.*, 2000). Kriteria perhitungan motilitas individu spermatozoa dapat dilihat dengan perhitungan seperti berikut: 90% pergerakan sangat aktif atau cepat, gelombang besar, 70-85% bergerak aktif/cepat, ada gelombang dengan gerakan massa yang cepat, 40-60% bergerak agak aktif/agak cepat, terlihat gelombang tipis dan jarang serta gerakan massa yang lambat, 20-30% bergerak kurang aktif, tidak terlihat gelombang, hanya gerakan individual spermatozoa, 10% gerakan individual spermatozoa (sedikit sekali gerakan individual spermatozoa atau tidak ada gerakan sama sekali (mati) (Salamah, 2014). Motilitas atau daya gerak spermatozoa yang dinilai segera sesudah penampungan semen umumnya digunakan sebagai ukuran

kesanggupan membuahi suatu contoh semen (Tripriliawan, Dadang dan Paulus, 2014).

c. Konsentrasi

Konsentrasi spermatozoa selama penelitian dihitung dengan menggunakan alat *haemocytometer* yang kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Semen yang telah ditampung diambil dengan menggunakan pipet *erythrocyt* sampai tanda 0,5ml kemudian ditambahkan dengan NaCl 3% sampai tanda 1,01ml, semen yang telah tercampur dengan NaCl 3% kemudian dihomogenkan dengan cara menggoyangkan-goyangkan seperti membentuk angka 8 selama 2-3 menit. Setelah itu cairan yang sudah homogen tersebut dibuang sebanyak 3-4 tetes kemudian 1 tetes ditetaskan pada *haemocytometer*, kemudian ditutup menggunakan *cover glass* dan dihitung dibawah mikroskop pada kotak kiri dan kanan atas, tengah dan kiri serta kanan bawah yang terdapat pada *haemocytometer* dengan perbesaran 400 kali dengan menggunakan *hand tally counter* (Susilawati 2011).

Konsentrasi = jumlah spermatozoa x 10 juta/ml

d. Viabilitas Spermatozoa (%)

Viabilitas merupakan persentase jumlah spermatozoa yang hidup dan yang mati. Pengamatan hidup mati spermatozoa atau viabilitas dapat dilakukan dengan membuat preparat ulas dengan metode pewarnaan menggunakan zat warna *eosin-negrosin*. Cara pengamatan dilakukan dengan meneteskan semen pada gelas objek, dan dicampur dengan satu tetes pewarna *eosin-negrosin*, kemudian diulas dengan cara menggesekkan ujung gelas objek lain pada gelas objek yang telah diolesi dengan campuran semen dan

eosin-negrosin dengan posisi 45°, ditunggu sampai mengering dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali (Arifiantini, 2012).

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Jumlah sel hidup}}{\text{Jumlah sel hidup} + \text{jumlah sel mati}} \times 100\%$$

e. Abnormalitas spermatozoa (%)

Abnormalitas spermatozoa merupakan suatu keadaan fisik spermatozoa tidak sempurna atau memiliki kelainan fisik. Pengamatan abnormalitas spermatozoa dilakukan sama halnya seperti pengamatan pada viabilitas spermatozoa, yakni dengan cara membuat preparat ulas yang kemudian diamati abnormalitasnya dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali(Susilawati 2011).

$$\% \text{Abnormalitas} = \frac{\text{jumlah sel abnormal}}{\text{Jumlah sel normal} + \text{jumlah sel abnormal}} \times 100\%$$

3.5 Analisis Data

Data dari hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis dengan uji rata-rata dan untuk membandingkan pengaruh suhu akhir pembekuan -40°C (P1) dengan -80°C (P2) digunakan uji-t terhadap variabel yang diamati. Astuti, (2007) menjelaskan bahwa Rumus uji-t tidak berpasangan adalah sebagai berikut.

$$t = \frac{|\bar{X}A - \bar{X}B|}{\sqrt{\frac{(nA)(S^2A) + (nB)(S^2B)}{nA + nB}}} \times \left(\frac{1}{nA} + \frac{1}{nB} \right)$$

Keterangan :

$\bar{X}A$: Rata-rata dataran rendah

$\bar{X}B$: Rata-rata dataran tinggi

nA : Jumlah data dataran rendah

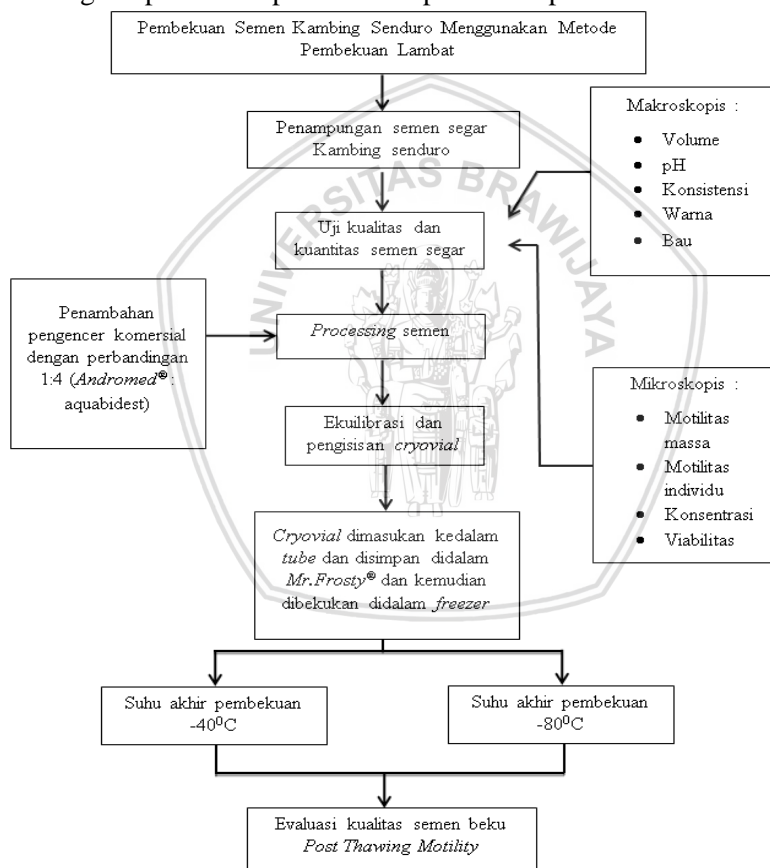
nB : Jumlah data dataran tinggi

S^2A : Ragam dataran rendah

S^2B : Ragam dataran tinggi

3.6 Kerangka Operasional Penelitian

Kerangka operasional penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kerangka operasional penelitian

3.7 Batasan Istilah

Metode pembekuan lambat :Teknik pembekuan yang lebih menekankan pada proses pembekuan lambat dan penurunan suhu dilakukan secara bertahap ($-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) dengan mesin pendingin yang dapat diprogram. (Kostaman. 2011).

Post Thawing Motility : Pemeriksaan kualitas semen setelah dilakukan proses pembekuan.

Mr.Frosty : Alat yang digunakan sebagai wadah (kontainer) untuk pembekuan sampel biologis dengan penambahan larutan *isopropil* alkohol pada kontainer untuk mencapai tingkat pendinginan yang direkomendasikan (Anonymous. 2010).



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kualitas Semen Segar Kambing Senduro

Uji Kualitas semen segar merupakan tahapan dasar sebelum diberikan perlakuan, karena nilai kualitas semen segar menjadi acuan tahapan penelitian selanjutnya. Kualitas semen segar kambing Senduro hasil pengamatan dapat dilihat pada (Tabel 1).

Tabel 1. Rata-rata kualitas semen segar Kambing Senduro hasil pengamatan dari 3 ekor kambing.

Uji Kualitas Semen Segar	Rata-rata \pm SD
Volume (ml)	0,63 \pm 0,15
Warna	Putih susu
Bau	Khas
Ph	6 \pm 0
Konsistensi	Kental
Motilitas massa	+++
Motilitas individu (%)	73,33 \pm 2,88
Viabilitas (%)	77,2 \pm 5,21
Abnormalitas (%)	6,41 \pm 0,95
Konsentrasi (juta/ml)	3120 \pm 63,66

Hasil pengamatan volume semen segar kambing Senduro rata-rata 0,63 \pm 0,15 ml/ejakulasi. Volume semen yang tertampung termasuk normal, volume semen kambing Senduro bervariasi menurut individu, umur, berat badan, pakan dan frekuensi penampungan. Dari hasil analisis semen segar kambing Senduro menunjukkan bahwa kualitas makroskopis dan mikroskopis yang diperoleh sesuai dengan kriteria kualitas

semen kambing unggul. Feradis, (2010) volume semen kambing yang normal adalah 0,5-2,5 ml. Menurut Garner dan Hafez, (2000) bahwa volume ejakulat semen domba atau kambing berkisar 0,8-1,2 ml/ejakulat.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semen kambing Senduro memiliki warna putih susu dan memiliki konsistensi kental. Semen kambing yang sehat pada umumnya berwarna keabu-abuan, putih susu atau putih kekuningan dengan konsistensi agak kental. Menurut Suyadi, Susilawati dan Isnaini, (2004) warna semen yang baik adalah putih krem, putih susu atau kuning, warna krem pada semen tergolong normal, warna krem ini disebabkan oleh adanya riboflavin dari sekresi kelenjar vesikularis. Menurut Suyadi, Rachmawati dan Iswanto (2012) warna, konsistensi dan konsentrasi spermatozoa mempunyai hubungan yang sangat erat satu dengan yang lain, artinya jika semen semakin encer maka konsentrasi spermatozoa semakin pucat. Hasil pengamatan menunjukkan bau semen yang ditampung termasuk normal dengan aroma khas semen dan sedikit bau amis. Semen yang normal pada umumnya memiliki bau amis khas disertai dengan bau dari hewan tersebut. Bau busuk bisa terjadi apabila semen mengandung nanah yang disebabkan adanya infeksi pada organ reproduksi jantan (Kartasudjana. 2001). Menurut Tolihere (1993) bau semen normal adalah berbau khas atau merangsang.

Berdasarkan Tabel.1 semen kambing Senduro yang ditampung memiliki konsistensi kental. Konsentrasi semen kambing Senduro yang ditampung rata-rata $3120 \pm 63,66$ juta/ml dengan warna putih susu. Feradis, (2010) penilaian konsistensi dapat dilakukan dengan cara menggoyang-goyangkan tabung *centrifuge* yang berisi semen secara perlahan-lahan. Semen dengan konsistensi kental akan mempunyai konsentrasi

spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan semen yang encer. Konsistensi dapat digunakan untuk memperkirakan konsentrasi spermatozoa secara cepat pada sampel semen yang diamati (Evans dan Mazwell, 1987). Konsentrasi spermatozoa atau kandungan spermatozoa dalam setiap mililiter semen merupakan salah satu parameter kualitas semen yang berguna untuk menentukan jumlah betina yang dapat diinseminasi dengan semen tersebut (Kartasudjana, 2001).

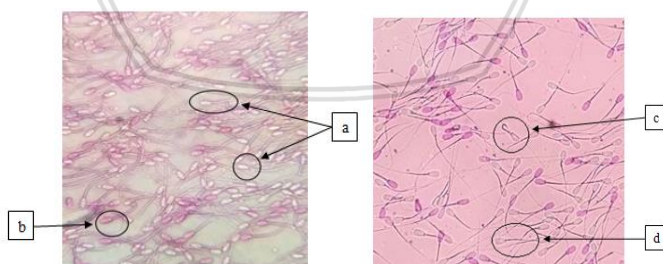
Penilaian konsentrasi spermatozoa kambing Senduro $3120 \pm 63,66$ jt/ml jumlah konsentrasi ini lebih tinggi dibandingkan dengan penjelasan Hafez (1993) konsentrasi spermatozoa berkisar antara 2000-3000 juta per ml. Sedangkan menurut Bretzlaff (1995), konsentrasi spermatozoa pada kambing berkisar 2500-5000 juta/ml. Tinggi rendahnya konsentrasi spermatozoa dipengaruhi oleh bangsa ternak. Ax *et al.* (2000) konsentrasi spermatozoa dipengaruhi oleh pakan, bangsa ternak, umur, suhu dan frekuensi ejakulasi. Toelihere (1981) konsentrasi spermatozoa dipengaruhi oleh volume semen, semakin rendah volume semen maka konsentrasi spermatozoa menjadi lebih tinggi.

Derajat keasaman (pH) pada semen kambing senduro yang didapat menunjukan hasil 6 ± 0 . Menurut Suyadi, Susilawati dan Isnaini, (2004) derajat keasaman (pH) semen kambing relatif agak asam yaitu berkisar antara 6,5-7,0, derajat keasaman sangat menentukan status kehidupan spermatozoa didalam semen, semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari pH normal akan membuat spermatozoa lebih cepat mati. Garner dan Hafez (2000) juga menyatakan bahwa pH semen kambing atau domba berkisar 5,9-7,3. Yani (2001) juga menjelaskan pH semen kambing PE berkisar 6,8-7,3.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas massa rata-rata 3+ atau (+++). Semen segar kambing Senduro yang ditampung dapat dikatakan normal, spermatozoa memperlihatkan daya gerak yang aktif dan gerakan massa yang bergelombang. Motilitas dapat memberikan gambaran tentang kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur dan selama pejalanannya baik didalam saluran reproduksi jantan maupun betina. Pamungkas (2008) gerakan massa dari spermatozoa cenderung bergerak bersama-sama ke satu arah membentuk gelombang-gelombang tebal dan tipis, bergerak cepat atau lambat, tergantung dari konsentrasi spermatozoa hidup, semakin gelombang pergerakannya cepat menandakan kualitasnya (++) dan kualitas sangat baik (+++), secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Motilitas individu spermatozoa dinilai segera sesudah penampungan semen. Dari hasil pengamatan semen segar secara mikroskopik diperoleh motilitas spermatozoa dengan rata-rata sebesar $73,33 \pm 2,88$ %. Hasil ini masih termasuk dalam kisaran normal karena sudah melebihi standar minimum kualitas semen yang dipakai untuk inseminasi buatan yaitu 50% spermatozoa yang hidup dan motil (Toelihere, 1993). Sedangkan menurut Hafez (2008) motilitas yang baik yaitu antara 60%-80%. Pergerakan individual spermatozoa dapat ditentukan sebagai berikut, 0% jika spermatozoa inmotil atau tidak ada gerakan sama sekali, 50% jika spermatozoa bergerak ditempat atau bergerak melingkar dan kurang dari 50% bergerak progresif, 50%-80% jika spermatozoa bergerak secara progresif dan membentuk gerakan massal, 90% jika spermatozoa bergerak sangat progresif dan terbentuk gelombang tebal (Ax, *et al.*, 2000).

Viabilitas merupakan salah satu indikator penentu kualitas semen karena berhubungan dengan daya hidup spermatozoa. Persentase daya hidup spermatozoa hasil pemeriksaan uji mikroskopis semen segar yang didapat sebesar $77,2 \pm 5,21\%$. Persentase daya hidup ini menunjukkan bahwa semen segar tersebut termasuk dalam kualitas baik dan layak untuk dilakukan proses selanjutnya. Toelihere (1993) semen yang normal biasanya mempunyai persentase hidup minimal 50%, jika persentase viabilitas tinggi maka fertilitas spermatozoa juga tinggi. Hal ini juga ditambahkan oleh Ducha, Susilawati, Aulanni'am dan Wahjuningsih (2013) syarat semen segar yang akan dibekukan yaitu memiliki persentase spermatozoa yang hidup minimal 70%. Perhitungan spermatozoa yang hidup dan yang mati dapat dilihat dengan menggunakan zat warna tertentu. Spermatozoa yang mati permeabilitas membrannya meningkat atau menyerap warna, sedangkan spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna. Gambar hasil pemeriksaan viabilitas dan abnormalitas dapat dilihat pada (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil pemeriksaan viabilitas dan abnormalitas dengan perbesaran 400x. a) Spermatozoa hidup. b) Spermatozoa mati. c) Spermatozoa abnormal. d) Spermatozoa normal.

Persentase abnormalitas semen segar menunjukkan nilai $6,41 \pm 0,95\%$. Hal ini menunjukkan bahwa semen segar dapat diproses lebih lanjut. Kisaran rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa ini sesuai dengan pendapat Garner and Hafez (2000), bahwa abnormalitas spermatozoa pada kambing berkisar 5-20%. Susilawati (2011) abnormalitas semen segar dikatakan baik apabila tidak lebih dari 20%. Abnormalitas spermatozoa dibagi menjadi dua kategori yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer terjadi pada saat proses spermatogenesis yang umumnya terjadi kelainan pada bagian kepala dan abnormalitas sekunder terjadi setelah proses spermiasi atau kelainan yang biasanya terjadi pada bagian ekornya (Riyadhi, Arifiantini dan Purwantara., 2010).

4.2 Motilitas Spermatozoa *Post Thawing* Kambing Senduro

Motilitas atau daya gerak spermatozoa merupakan ukuran yang digunakan sebagai kesanggupan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Rataan tertinggi persentase motilitas spermatozoa yaitu pada perlakuan kedua setelah proses pembekuan. Hasil pengamatan motilitas individu pada semen segar rata-rata $70 \pm 0,00\%$. Setelah mendapatkan perlakuan pendinginan dan pembekuan diperoleh hasil rata-rata terbaik pada perlakuan pembekuan dengan suhu akhir (-80°C) sebesar $48,33 \pm 2,88$ dan $10,93 \pm 0,04\%$, sedangkan suhu akhir pembekuan (-40°C) diperoleh $48,33 \pm 2,88$ dan $2,81 \pm 0,02\%$. Berikut hasil statistik perhitungan motilitas rata-rata semen beku kambing Senduro dengan menggunakan pembekuan lambat dapat dilihat pada (Tabel 2).

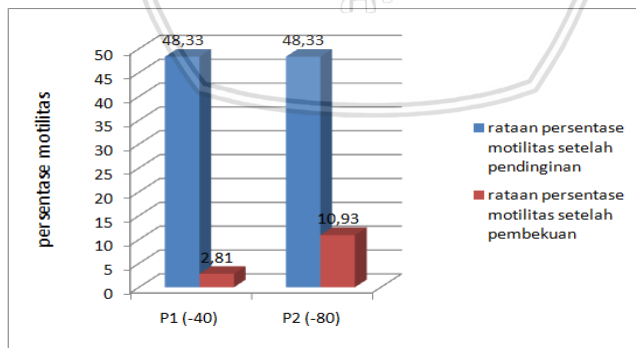
Tabel 2. Rata-rata Motilitas Spermatozoa *post thawing* Kambing Senduro.

Perlakuan	Motilitas (%)	
	Pendinginan	Pembekuan
P1 (-40°C)	48,33±2,88%	2,81±0,02% **
P2(-80°C)		10,93±0,04% **

Keterangan: Uji t tidak berpasangan** = sangat nyata ($P < 0,01$)

Hasil pengamatan diuji dengan menggunakan analisa statistik yang terdapat pada (Lampiran 4). Dari hasil statistik diperoleh hasil rata-rata dengan suhu akhir pembekuan P1(-40°C) dan P2(-80°C) dengan tingkat perbandingan pengenceran komersial dan *aquabidest* 1:4 dan disimpan selama 24 jam, diperoleh nilai sebesar 2,81±0,02% dan 10,93±0,04% ini menunjukkan hasil berbeda sangat nyata ($P < 0,01$). Hasil ini juga menunjukkan adanya penurunan tingkat motilitas individu setelah proses pendinginan dan pembekuan. Nilai yang dihasilkan ini tidak sesuai dengan standar motilitas yang baik setelah pembekuan yaitu 40%. Menurut Kartasudjana (2001) bahwa spermatozoa yang memiliki motilitas kurang dari 60% tidak dianjurkan untuk program inseminasi buatan. Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan menunjukkan penyimpanan semen beku dengan suhu akhir pembekuan (-80°C) memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan suhu akhir pembekuan (-40°C). Perbedaan penurunan motilitas setelah proses pembekuan selama 24 jam diduga disebabkan titik beku yang menyebabkan kerusakan sel secara fisik maupun kimia

lebih tinggi. Pada pembekuan dengan suhu akhir (-40°C) dengan laju pembekuan $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ menyebabkan banyak kerusakan pada spermatozoa hal ini disebabkan karena terbentuknya kristal-kristal es pada proses pembekuan. Park dan Graham (1993) kerusakan pertama pada membran spermatozoa terjadi pada proses pembekuan dan *thawing* antara suhu -15°C sampai -60°C tetapi tidak terjadi selama penyimpanan di nitrogen cair. Menurut Febriani, Hamdan dan Melia (2014) pada saat pembekuan spermatozoa banyak mengalami kerusakan pada suhu-suhu kritis antara -15°C dan -30°C , rata-rata pada suhu -17°C . Hal ini menunjukkan bahwa suhu pembekuan (-40°C) merupakan suhu kritis spermatozoa yang banyak menyebabkan sel spermatozoa mati. Pada pembekuan lambat kerusakan sel sangat rentan terjadi dikarenakan masih terbentuknya kristal es, terjadinya penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya didalam larutan atau didalam sel-sel saat proses pembekuan. Gambar 4 menunjukkan bahwa suhu akhir pembekuan (-80°C) lebih baik dibandingkan dengan suhu akhir pembekuan (-40°C).



Gambar 4. Rataan Motilitas Individu Spermatozoa Setelah Proses Pendinginan dan Pembekuan

Pada saat pembekuan laju penurunan suhu antara P1(-40°C) dan P2(-80°C) sama yaitu 1°C/menit, laju penurunan suhu pembekuan yang lambat sangat mempengaruhi kerusakan sel spermatozoa. Kostaman ,(2011) jika pembekuan terlalu lambat maka air akan banyak keluar dari sel, untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi air intraseluler dan ekstraseluler serta terjadi dehidrasi untuk menghindari pembekuan intraseluler. Pembekuan lambat menyebabkan dehidrasi moderat, misalnya dengan kecepatan 1°C/menit hingga mencapai suhu -35°C. Hal ini juga sesuai dengan Herdiawan,(2004) metode pembekuan lambat (7°C/menit) menyebabkan kerusakan sel spermatozoa karena terjadinya proses dehidrasi akibat perbedaan konsentrasi cairan intraseluler dengan ekstraseluler. Hal tersebut menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, sehingga selubung lipoproteinnya pecah dan membran sel mengalami kerusakan dan pada akhirnya spermatozoa kehilangan daya motilitasnya. Hilangnya daya motilitas spermatozoa selama proses pembekuan akan berpengaruh terhadap laju pemulihan (*recovery rate*) spermatozoa setelah mengalami pencairan kembali.

Proses pembekuan akan mengakibatkan terjadi peroksidasi lipid pada spermatozoa kambing sehingga dapat menyebabkan kehilangan motilitas, hambatan terhadap fruktolisis, keluarnya enzim intraseluler dan kerusakan struktur membrane plasma (Feradis, 2010). Peroksidasi lipid sering terjadi pada saat proses kriopreservasi yang dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa, dimana membran plasma spermatozoa memiliki kandungan asam lemak tak jenuh sehingga rentan terhadap kerusakan peroksidasi (Feradis,2009). Alfy, Isnaeni dan Susanti (2013), peroksidasi lipid akan

menyebabkan kerusakan struktur dan terganggunya metabolisme spermatozoa yang berakibat spermatozoa mati, pembentukan *Reactive Oxygen Species*, diikuti dengan reaksi propagasi sehingga menyebabkan kerusakan sel. Menurut Ramdhany, Agung dan Aulanni'am (2012) terbentuknya peroksidasi lipid akan mengganggu fisiologi membran dan menyebabkan gangguan pada aliran cairan dan permeabilitas serta mengubah transpor ion sehingga menghambat reaksi metabolisme.

Pada saat proses pencairan kembali atau *thawing*, semen beku yang berada didalam *cryovial* dengan kapasitas 1,5 ml dimasukan ke dalam air hangat yang memiliki suhu 37°C, proses pencairan ini membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu sekitar 2-3 menit, lamanya waktu pencairan kembali ini menyebabkan spermatozoa banyak yang mati. Rosadi, Teguh dan Darmawan (2015) kematian spermatozoa dapat disebabkan ketika proses pencairan kembali setelah proses pembekuan, hilangnya daya motilitas spermatozoa selama proses pembekuan akan berpengaruh terhadap laju pemulihan spermatozoa setelah mengalami pencairan kembali. Menurut Toelihere (1993) *thawing* dilakukan pada air dengan temperatur 34°C selama 15 detik. Sedangkan menurut Aprilina, Suharyati dan Purnama (2014) apabila lama *thawing* terlalu lama yaitu 20 detik akan menyebabkan motilitas spermatozoa rendah. Selama pada fase *thawing* suhu dan waktu pengenceran sangat mempengaruhi daya hidup spermatozoa. Febriani, Hamdan dan Melia (2014) *thawing* pada termperatur tinggi untuk waktu yang terlalu lama dapat mengakibatkan fluktsi pH dan kemudian denaturasi protein dan kematian sel.

Berdasarkan hasil pengamatan, diperoleh hasil terbaik motilitas individu *post thawing* dengan perlakuan penyimpanan

pada suhu akhir yang berbeda pada P2 dengan suhu akhir pembekuan -80°C yaitu $10,93 \pm 0,04\%$ sedangkan pada P1 dengan suhu akhir -40°C lebih rendah $2,81 \pm 0,02\%$ hal ini disebabkan karena suhu pembekuan -40°C merupakan suhu kritis sel spermatozoa saat dibekukan dan juga lama *thawing* yang mengakibatkan banyak kematian pada sel spermatozoa.

4.3 Viabilitas Spermatozoa *Post Thawing* Kambing Senduro

Viabilitas atau daya hidup spermatozoa adalah syarat mutlak bagi terjadinya fertilisasi. Rataan persentase viabilitas semen segar kambing Senduro adalah $77,2 \pm 5,21\%$ setelah mendapatkan perlakuan pendinginan diperoleh hasil $65,86 \pm 4,91\%$. Rata-rata viabilitas spermatozoa kambing Senduro setelah pendinginan dan pembekuan dapat dilihat pada (Tabel 3).

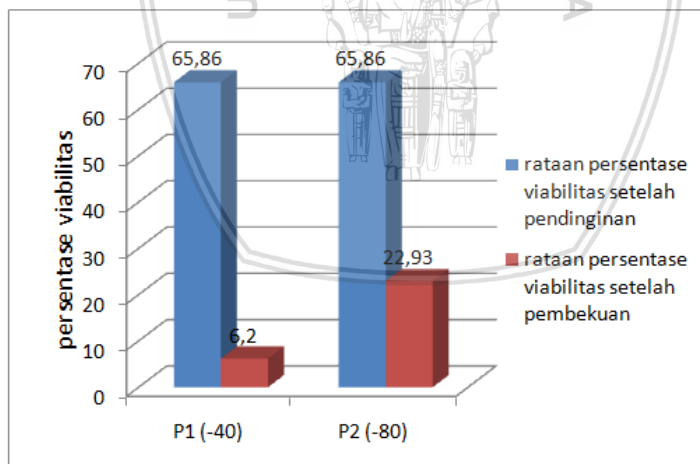
Tabel.3 Rata-rata Viabilitas Spermatozoa *post thawing* Kambing Senduro.

Perlakuan	Viabilitas (%)	
	Pendinginan	Pembekuan
P1 (-40°C)	$65,86 \pm 4,91\%$	$6,20 \pm 0,03\%^{**}$
P2 (-80°C)		$22,93 \pm 0,11\%^{**}$

Keterangan: Uji t tidak berpasangan^{**} = sangat nyata ($P < 0,01$)

Hasil pengamatan diuji dengan menggunakan analisis statistik (Lampiran 5) menunjukkan bahwa dua perlakuan suhu akhir pembekuan yang berbeda menunjukkan hasil berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas individu spermatozoa

setelah proses pembekuan. Tabel 3 menunjukkan hasil analisis persentase viabilitas spermatozoa pada perlakuan P2 (-80°C) dengan nilai $22,93 \pm 0,11\%$ lebih baik dibandingkan perlakuan P1 (-40°C) dengan nilai $6,20 \pm 0,03\%$. Perbedaan rata-rata ini bisa disebabkan karena pengaruh fisik pada saat perlakuan sehingga menimbulkan kematian. Gesekan antar spermatozoa dapat menyebabkan abnormalitas sekaligus kematian. Perera, (2013) terjadinya penurunan viabilitas spermatozoa setelah proses pendinginan dan pembekuan bisa disebabkan karena pengaruh fisik saat perlakuan yang menyebabkan kematian. Pengaruh fisik tersebut diakibatkan oleh gesekan antar spermatozoa, antara spermatozoa dengan dinding tabung, atau antara globul lemak dari pengencer sehingga menyebabkan kecenderungan penurunan viabilitas. Rendahnya persentase viabilitas setelah proses pembekuan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Rataan persentase Viabilitas Spermatozoa Setelah Proses Pendinginan dan Pembekuan

Dari grafik diatas diperoleh hasil rata-rata viabilitas spermatozoa setelah proses pendinginan yaitu $65,86 \pm 4,91\%$. Setelah mengalami proses pendinginan rata-rata persentase viabilitas menurun. Penurunan viabilitas terjadi pada saat dilakukan pengenceran yang mengakibatkan adanya kerusakan membran sel sehingga terjadi kematian sel. Maxwell dan Watson (1996) proses berlangsungnya pengenceran semen dapat merusak membran sel spermatozoa sehingga mengakibatkan spermatozoa mati. Kerusakan pada membran sel spermatozoa akan berdampak pada membran semi permeable yang tidak lagi mampu menyeleksi keluar masuknya zat, sehingga pada saat dilakukan uji warna, *eosin-negrosin* tersebut masuk kedalam plasma.

Rendahnya nilai viabilitas spermatozoa menunjukkan bahwa suhu akhir pembekuan (-40°C) dan (-80°C) dengan laju pembekuan $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ banyak menyebabkan spermatozoa mati hal ini disebabkan karena terbentuknya kristal es sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan sel spermatozoa. Watson, (2000) kerusakan sel akibat kristal es disebabkan oleh elektrolit yang menumpuk yang akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Dehidrasi yang diakibatkan pembekuan lambat juga menyebabkan penurunan viabilitas serta motilitas spermatozoa setelah pembekuan. Susilawati, (2013) selama proses pembekuan–*thawing* penurunan persentase dapat mencapai 50% spermatozoa mati. Penurunan nilai viabilitas ini juga disebabkan karena metode pembekuan lambat. Proses pembekuan semen pada dasarnya akan menyebabkan terjadinya pembentukan kristal-kristal es, hal ini dapat menyebabkan kerusakan terhadap sel spermatozoa secara mekanik, ketika membran plasma rusak maka proses

metabolisme akan terganggu sehingga sintesis ATP tidak dapat berjalan secara normal dan akan mengakibatkan menurunnya daya tahan hidup spermatozoa (Sukmawati, Arifiantine dan Puerwantara 2014). Adenosine Tri Phosphate (ATP) dihasilkan oleh fosforilasi oksidatif didalam membran mitokondria dan ditransfer ke mikrotubulus untuk motilitas, oleh karena itu menurunnya motilitas spermatozoa akibat pembekuan diyakini terkait dengan kerusakan mitokondria (Januskauskas dan Zillinskas, 2002).

Penurunan persentase viabilitas juga dapat disebabkan karena pengaruh lama waktu *thawing*. Lama waktu *thawing* yang dilakukan pada saat penelitian yaitu 2-3 menit dengan suhu 37°C. Ade, Susilawati dan Wahjuningsih (2012) suhu *thawing* serta durasi yang tidak sesuai dapat mengakibatkan membran spermatozoa mengalami kerusakan sebagai akibat cekaman panas dan kontak dengan oksigen, dimana membran tersusun atas fosfolipid akan mengalami reduksi karena timbulnya asam lemak dari proses peroksidasi sel. Menurut Aprilina., Suharyati dan Purnama (2014) lama *thawing* yang terlalu lama akan memberikan dampak penurunan terhadap hidup spermatozoa hal ini terjadi karena peningkatan aktivitas metabolisme spermatozoa yang menghasilkan asam laktat dalam konsentrasi yang tinggi akibat peroksidasi lipid yang mengakibatkan menurunnya daya tahan hidup spermatozoa.

4.4 Abnormalitas Spermatozoa *Post Thawing* Kambing Senduro

Spermatozoa yang memiliki morfologi yang normal merupakan syarat bagi terjadinya fertilitasi. Abnormalitas merupakan keadaan dimana spermatozoa mengalami kerusakan pada salah satu atau seluruh bagian tubuh spermatozoa.

Abnormalitas spermatozoa dibagi menjadi dua kategori yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Hafez, dan hafez (2000) abnormalitas primer terjadi sewaktu proses spermatogenesis maupun adanya testikuler, dan abnormalitas sekunder terjadi setelah spermatozoa meninggalkan tubuli seminiferi menuju saluran reproduksi jantan, sedangkan abnormalitas tersier terjadi setelah ejakulasi sampai pada proses *handling*. Hasil pengamatan rata-rata abnormalitas spermatozoa segar $6,41 \pm 0,95\%$, setelah mendapatkan perlakuan pendinginan diperoleh hasil $7,78 \pm 1,72\%$. Rata-rata abnormalitas spermatozoa setelah pendinginan dan pembekuan dapat dilihat pada (Tabel 4).

Tabel 4. Rata-rata Abnormalitas Spermatozoa *post thawing* Kambing Senduro.

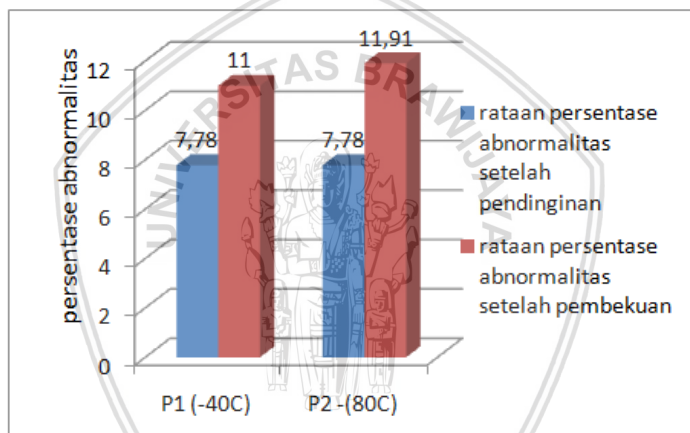
Perlakuan	Abnormalitas (%)	
	Pendinginan	Pembekuan
P1 (-40°C)	$7,78 \pm 1,72\%$	$11 \pm 0,03\%$
P2(-80°C)		$11,91 \pm 0,02\%$

Hasil pengamatan rata-rata persentase abnormalitas diuji dengan menggunakan analisis statistik (Lampiran 6) menunjukkan pengaruh suhu akhir pembekuan semen kambing Senduro tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa kambing Senduro pasca *thawing*. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa setelah pembekuan diperoleh hasil abnormalitas tertinggi pada perlakuan P2 dengan suhu akhir pembekuan (-80°C) $11,91 \pm 0,02\%$, sedangkan

pada P1 dengan suhu akhir pembekuan (-40°C) diperoleh nilai lebih rendah $11 \pm 0,03\%$. Pendinginan menyebabkan peningkatan abnormalitas dan kerusakan sel namun masih dapat teratasi dengan adanya pengencer yang mengandung lesitin dan lipoprotein yang berfungsi melindungi dalam mempertahankan integritas selubung lipoprotein dari sel dan mencegah cekaman dingin. (Ihsan, 2008) peningkatan abnormalitas setelah proses pendinginan dan pembekuan disebabkan oleh pengaruh fisik spermatozoa yang menyebabkan spermatozoa abnormal. Perubahan suhu dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel dinding spermatozoa dan mengakibatkan pemecahan membran, dan pengeluaran enzim (Munazaroh, 2013). Jumlah spermatozoa yang abnormal semakin meningkat, akan menyebabkan rendahnya kesuburan semen ternak tersebut.

Laju penurunan suhu pada proses pembekuan dengan suhu akhir (-80°C) dan (-40°C) yaitu $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata. Herdiawan (2004) tingkat laju pembekuan lambat maupun cepat pada media yang berbeda akan berpengaruh sekali pada tingkat abnormalitas spermatozoa sebagai akibat terjadinya perubahan fisik media hidupnya, baik perubahan tekanan osmotik, maupun pembentukan kristal-kristal es intraseluler, hal tersebut dapat menyebabkan perubahan struktur spermatozoa seperti bentuk spermatozoa yang ekornya membengkok atau kepala terlepas. Fluktuasi perubahan suhu pembekuan dan pada saat *thawing* akan mengurangi proporsi spermatozoa motil dan menyebabkan kerusakan ultrastruktural, biokimia dan fungsional. Pendinginan semen dari 5°C ke suhu pembekuan sebenarnya mengakibatkan spermatozoa mengalami abnormalitas dengan mitokondria membengkok, penyusutan spermatozoa, dan ekor

melingkar. Penyebab spermatozoa membengkok dan pecah serta membengkoknya membran spermatozoa diakibatkan tekanan osmotik yang hipotonis. Pacc *et al* (1981) tekanan osmotik yang tinggi dapat menyebabkan bagian leher spermatozoa membengkok (*neck bent*) atau spermatozoa yang membengkok (*bent spermatozoa*) sedangkan penyusutan spermatozoa mengakibatkan keluarnya cairan dari badan sel spermatozoa. Persentase rataan abnormalitas setelah proses pembekuan dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Rataan Abnormalitas Spermaozoa Setelah Proses Pendinginan dan Pembekuan.

Jumlah abnormalitas spermatozoa yang semakin meningkat akan mempengaruhi rendahnya kesuburan semen ternak. Sel spermatozoa yang abnormal meskipun dapat membuahi sel telur namun biasanya berakhir dengan kematian sebelum dilahirkan. Menurut Tambing, Toelihere, Yusuf, dan Utama (2000) abnormalitas sering ditandai oleh adanya

kelainan pada kepala dan ekor (kepala membesar atau mengecil, ekor pendek atau hilang).

Bentuk abnormalitas yang diamati setelah *post-thawing* yaitu diantaranya ada yang ekornya melingkar, ekor pendek, leher menekuk dan kepala menyusut. Menurut Afiat, (2015) abnormalitas spermatozoa dikelompokkan menjadi *pyriform* (bentuk yang menyempit di bagian *post acrosome*), *detached head* (kepala yang terpisah dari ekor), *pear shaped* (bagian anterior akrosom membulat), *macrocephalus* (kepala lebih besar), *microcephalus* (kepala lebih kecil daripada normal), *double head* (satu sel memiliki dua kepala dan satu ekor), *nuclear vacuolus* (terdapat vacuola di bagian kepala spermatozoa yang menunjukkan abnormalitas inti dan kromatin sel), *underdeveloped* (perkembangan yang tidak sempurna, ukuran yang lebih kecil daripada normal, ekor pendek dengan material sel yang belum sempurna pada pengamatan selanjutnya), *round head* (bentuk kepala yang membulat), *abnormal contour* (bentuk yang abnormal di kepala maupun ekor), *abaxial* (terbentuk fossa perlekatan di bagian tengah ekor), *abnormal decondensation* (abnormalitas kondensasi DNA spermatozoa), *decapacitation* (mengalami kapasitas dini), *defect midpiece* (kerusakan pada bagian *midpiece* seperti ekor yang melingkar, patah, dan melipat), dan *distal cytoplasmic droplet*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Suhu akhir pembekuan -40°C dan -80°C dengan metode pembekuan lambat menggunakan alat *Mr.Frosty* dengan penurunan suhu $-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ memberikan pengaruh positif terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa.
2. Kualitas semen beku *post thawing* dengan metode pembekuan lambat $-1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ pada suhu akhir -40°C dan -80°C tidak dapat digunakan untuk program teknologi IB berstandart SNI.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diambil adalah pembekuan lambat pada semen kambing Senduro dengan suhu akhir pembekuan (-80°C) dan (-40°C) tidak dianjurkan digunakan untuk IB, melainkan digunakan untuk teknologi reproduksi lainnya dan sebaiknya dilakukan lagi penelitian tentang pengembangan pembekuan metode lambat khususnya dalam *thawing* menggunakan alat *Mr.Frosty*[®].

DAFTAR PUSTAKA

- Ade, M. S., T. Susilawati dan S. Wahjuningsih. 2012. Pengaruh Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet*.12(2): 14-19.
- Afiati, F. Yulnawati, M. Riyadi dan R. I Arifiantni. 2015. Abnormalitas Spermatozoa Domba dengan Frekuensi Penampungan Berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(4): 930-934.
- Aku, A.S., B. Purwantara dan M.R. Toelihere. 2007. Persevasi dan Kriopreservasi Semen Domba Garut (*ovis aires*) dalam Berbagai Jenis Pengencer Berbasis Lesitin. *Agriplus*. 17(1): 44-51.
- Alfy R. Y., W. Isnaeni dan R. Susanti. 2013. Pengaruh Pemberian Vitamin E terhadap Kualitas Sperma Tikus Putih yang Dipapar Timbale. *Jurnal Ilmu Biologi*. 2(2): 92-99.
- Anonimous. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfullund Labortechnik. GmbH & Co KG Germany. http://www.minitube.de/DE_eng. Diakses tanggal 26 Februari 2018.
- . 2010. Mr. Frosty™ Freezing Container. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/51000001?SID=srch-srp-5100-0001>. Diakses pada tanggal 19 Oktober 2017.

- , 2011. AndroMed®200 ml. Certificate Andromed Minitub Abfullund Labortechnik GmbH & Co KG Germany. http://www.minitube.de/DE_eng. Diakses pada tanggal 23 Oktober 2017.
- , 2014. Penetapan Galur Kambing Senduro. Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia No. 1055/Kpts/SR.120/10/2014.
- , 2015. Data Statistik Populasi Ternak Kecil di Kecamatan Senduro Kabupaten Lumajang Tahun 2015. https://lumajangkab.go.id/ternak_kecil.php. Diakses pada tanggal 7 Februari 2017.
- , 2016. Kambing Senduro Ternak Unggulan Kabupaten Lumajang. <http://disnak.jatimprov.go.id>. Diakses pada tanggal 7 Februari 2017.
- Arifiantini, I. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan. IPB Press. Bogor.
- Aprilina, N., S. Suharyati dan E. S. Purnama. 2014. Pengaruh Suhu dan Lama Thawing di Dataran Rendah terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simental. Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu. 2(3):96-102.
- Astuti, M. 2007. Pengantar Ilmu Statistik Untuk Peternakan dan Kesehatan Hewan. Binasti Publisher. Bogor.
- Ax, R. L., Dally, M. R., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C. C., Varner, D. D., Hafez, B. And Bellin, M. E. 2000. *Semen Evaluation*. In E.S.E. Hafez Edt. Reproduction in

Farm Animal 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

Badan Pusat Statistik. 2015. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan. <http://ditjennak.pertanian.go.id>. Disakses pada tanggal 7 Februari 2017.

Boediono, A. 2003. Vitrifikasi vs Pembekuan Lambat pada Pembekuan Embrio. Symposium Perkumpulan Teknologi Reproduksi Indonesia (PATRI). Denpasar.

Boediono dan W. Koster. 2004. Teori dan Aplikasi Statistika dan Probabilitas. PT. Remaja Rosdakarya. Bandung

Ciptadi, G. 2012. Bioteknologi Sel Gamet dan Kloning Hewan. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang.

Ducha, N., T. Susilawati, Aulanni'am dan S. Wahjuningsih. 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Refrigerator dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. Jurnal Kedokteran Hewan. 7 (1): 5-8.

Evans and Maxwell. 1987. Membran Structure and Function. IRL Press. Oxford University. Oxford.

Febriani, G. D., Hamdan dan J. Melia. 2014. Pengaruh Waktu Ekualibrasi Terhadap Kualitas Semen Kerbau Lumpur (*Babulus bubalis*) Setelah *Thawing*. Jurnal Medika Veterinaria. 8 (1): 1-4.

Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung.

- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Plasma Semen in Reproduction. In Farm Animal. Hafez E.S.E. and B. Hafez (eds.). 7th ed. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA: 82-95.
- Gazali, M. dan S. N. Tambing. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. Jurnal Ilmu Hayati. 9(1): 27-32.
- Herdiawan, I. 2004. Pengaruh Laju Penurunan Suhu dan Jenis Pengencer terhadap Kualitas Semen Beku Domba Priangan. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 9(2): 98-107.
- Heriyanta, E., M. N. Ihsan dan N. Isnaini. 2013. Pengaruh Umur Kambing Peranakan Etawah (PE) Terhadap Kualitas Semen Segar. Jurnal Ternak Tropika. 14(2): 1-5.
- Hikmawan, S. W., G. Ciptadi dan S. Wahjuningsih. 2016. Kualitas Spermatozoa *Swim Up* Kambing Peranakan Etawah Hasil Pembekuan Menggunakan Metode Vitrifikasi Dengan Persentase Gliserol Yang Berbeda. Jurnal Ternak Tropika. 17 (1): 42-48.
- Ihsan, M. N 2009. Bioteknologi Reproduksi Ternak. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Ihsan, M. N. 2011. Penggunaan Telur Itik sebagai Pengencer Semen Kambing. Jurnal Ternak Tropika. 12(1):10-14.
- Ismaya. 2014. Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau. UGM Press. Yogyakarta.

- Januskauskas, A., and H. Zillinskas. 2002. Bull Semen Evaluation Post-thaw and Relation of Semen Characteristics to Bull's Fertility. *Journal Veteriner Zootechnics*; 17(39):1392-2130
- Kartasudjana, R. 2001. Teknik Inseminasi Buatan pada Ternak. Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta.
- Kostaman, T. dan A. R. Setioko. 2011. Perkembangan Penelitian Teknik Kriopreservasi untuk Penyimpanan Semen Unggas. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 21(3):145-152.
- Lestari, S., M. S. Dadang dan Maidaswar. 2013. Profil Kualitas Semen Segar Sapi Pejantan Limousin dengan Umur yang Berbeda di Balai Inseminasi Buatan Lembang Jawa Barat. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 1 (3): 1165 -1172.
- Lopes, F.P. 2002. Semen Collection and Evaluation in Ram. University of Florida.
- Lubis, T. M., Dasrul, C. N. Thasmi dan T. Akbar. 2013. Efektifitas Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Setelah Penyimpanan Dingin. *Jurnal Ilmu Pertanian*. 3(1):347-361

- Luthan, F. 2010. Pedoman Teknis Alat Mesin dan Ulib Budidaya Ternak Ruminansia. Kementerian Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan.
- Maxwell and Watson. 1996. Recent Progress in the Prevervation of Ram Semen. *Animal Reproduction Science*. 4 (2):55-65.
- Melkianus, L.,M. Jadi, A. Supit, D. Kusumaningrumdan H. Andrijanto. 2015. Evaluasi Kualitas Semen Beku Akibat Perbedaan Metode Lama Equilibrasi dan Lama Penurunan Suhu Selama Prosesing Semen. *Jurnal Ilmu Peternakan*. 2(2):170-177
- Munazaroh A. M.,S. Wahjuningsih dan G. Ciptadi. 2013.Uji Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Hasil Pembekuan Menggunakan Mr. Frosty® Pada Tingkat Pengenceran Andromed® Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. 14 (2):63-71.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 16 (2): 172-179.
- Novianto, B.R., Sudarno dan E.D Masithah. 2014. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Gliserol dalam Susu Skim Kuning Telur untuk Proses Penyimpanan Sperma Beku Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius Pangasius*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 6 (1): 1-6.

- Pacc, M.M., J.J. Sullivan, F.I. Elliot, E.T. Graham and G.H. Coulter. 1981. Effect of Thawing Temperature, Number of Spermatozoa, and Spermatozoa Quality on Fertility of Bovine Spermatozoa. *Journal Animal Science*. 53(3): 693-701.
- Pamungkas, F. A. 2009. Potensi dan Kualitas Semen Kambing dalam Rangka Aplikasi Teknologi Inseminasi Buatan. *Loka Penelitian Kambing Potong*. 19(1):17-22
- Pamungkas, F.A., A. Batubara dan Anwar. 2014. Kriopreservasi Spermatozoa Kambing Boer Perbandingan Dua Bahan Pengencer Terhadap Kualitas Post-Thawing dan Kemampuan Fertilitasnya. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 19 (2): 130-137.
- Parks, J.E. and J. K. Graham. 1992. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology*.
- Permatasari, F.R., A. P. W. Mahendra dan Aulanni'am. 2013. Studi Terapi Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) terhadap Penurunan Kadar Malondialdehyda (MDA) pada Organ Testis dan Spermatozoa Tikus (*Rattus Norvegicus*) Hasil Induksi Paparan Asap Rokok. *Jurnal Medical Veteriner*. 4(1) :1-10.
- Puji, T. S. L., M. N. Ihsan dan N. Isnaini. 2014. Pengaruh Waktu Simpan Semen Segar dengan Pengencer Andromed pada Suhu Ruang terhadap Kualitas Semen Kambing Boer. *Junal Ternak Tropika*. 15 (1): 43-50.

Putra, R. P., S. Wahjuningsih dan G. Ciptadi. 2013. Uji Kualitas Spermatozoa Kambing Boer yang Dibekukan dengan Alat *Mr. Frosty* Menggunakan Pengencer Andromed® Pada Suhu Penyimpanan -45°C. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan. 27 (3): 1-13.

Ramdhany, A. P., P. W. M. Agung dan Aulanni'am. 2012. Studi Terapi Ekstrak Buah Manggis (*Garcinia Mangostana L.*) terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada Organ Testis dan Jumlah Spermatozoa tikus (*Rattus Novergicu*) Hasil Induksi paparan Asap Rokok. Jurnal Medical Veteriner. 3(4): 1-10

Riyadhi, M., R. I. Arifiantini dan B. Purwantara. 2010. Kajian Morfologi Spermatozoa Sapi Simmental di Beberapa Balai Inseminasi Buatan di Indonesia. Jurnal Medical Veteriner. 1 (2): 1-7.

Rizal, M., Herdis, B. Arief, S. A. Achmad dan Yulnawati. 2006. Peranan Beberapa Jenis Gula dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Domba Garut. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 11 (2): 123-130.

Rizal, M., dan Nasrullah. 2004. Pemanfaatan Spermatozoa Epididimis dalam Teknologi Reproduksi. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 14(1): 14-20.

Ruiz-Pesini, E., E. Alvarez, J. Enriquez, and M. Lopez-Perez. 2001. Association Between Seminal Plasma Carnitine

and Sperm Mitochondrial Enzymatic Activities. International Journal of Andrology. 24 (6):335-340.

- Situmorang, P. 2002. Pengaruh penambahan eksogenous phospholipid ke dalam pengencer Tris dengan tingkat kuning telur yang berbeda pada daya hidup spermatozoa sapi. JITV 7(3): 181-187.
- Sukmawati, E.,R. I. Arifiantine dan B. Puerwantara. 2014. Daya Tahan Spermatozoa Terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Sapi Pejantan Unggul. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 9(3):168-175.
- Surachman, M., Herdis., Setadi, A. M dan Rizal, M. 2006. Kriopreservasi Spermatozoa Epididimis Domba Menggunakan Pengencer Berbasis Lesitin. Jurnal Ternak Tropika. 31 (2): 83-89.
- Susilawati, T. 2011. Spermatology. UB Press.Malang.
- Susilawati, T. 2013. Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang.
- Suyadi, T. Susilawati dan N. Isnaini. 2004. Uji Coba Produksi Semen Beku Kambing Boer. Laporan Penelitian Kerjasama Ditjen Peternakan. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Suyadi, A. Rachmawati, dan N. Iswanto. 2012. Pengaruh *α-Tocopherol* yang Berbeda Dalam Pengencer Dasar *Tris Aminomethane* - Kuning Telur Terhadap Kualitas

- Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 5°C.
Jurnal Ilmu-Ilmu peternakan. 22(3):1-8
- Tambing, S. N., M. R. Toelihere., T. I. Yusuf dan I. K. Utama.
2000. Pengaruh Gliserol dalam Pengencer Tris terhadap
Kualitas Semen Beku Kambing Pernakan Etawah.
Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner. 5(2):1-8.
- Toelihere, M. R. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak.
Mutuara, Bandung.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak.
Angkasa. Bandung.
- Tripriliawan, D., M. S. Dadang dan S. Paulus. 2014. Perbedaan
Volume Semen, Konsentrasi, dan Motilitas
Spermatozoa Pejantan Sapi FH di BIB Lembang
dengan Interval Penampungan 72 Jam dan 96 Jam.
Jurnal Ilmiah Peternakan. 2(1): 227-232.
- Watson, P.F. 2000. The Causes of Reduced Fertility with
Cryopreserved Semen. Animal Reproduction Science.
60 (61): 481-492.
- Yani, A., Nuryadi dan Pratiwi. 2001. Pengaruh Tingkat
Substitusi Santan Kelapa pada Pengencer Tris dan